

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Adriana A. Feltrin Correa

Epidemiologia molecular, fatores de risco e prognóstico da infecção por *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina em situação de introdução recente: um estudo em dois hospitais públicos de Bauru-SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMB/UNESP), para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Co-orientador: Prof. Tit. Antônio Carlos C. Pignatari

Botucatu – 2014

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Correa, Adriana Aparecida Feltrin.

Epidemiologia molecular, fatores de risco e prognóstico da infecção por *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina em situação de introdução recente : um estudo em dois hospitais públicos de Bauru-SP / Adriana Aparecida Feltrin Correa. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Coorientador: Antônio Carlos C. Pignatari

Capes: 40101096

1. *Enterococcus*. 2. Agentes antibacterianos. 3. Vancomicina. 4. Resistência a vancomicina. 5. Fatores de risco.

Palavras-chave: *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina; Epidemiologia molecular; Fatores de risco; VRE.

Agradecimientos

Agradecimentos

À Deus, pois Ele é o princípio de todo saber.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, por entrar em meu caminho e abrir as portas que me conduziram à realização deste grande sonho que mudou para sempre meu destino. Sua forma ímpar de alimentar-nos com seu conhecimento jamais será esquecida.

Ao meu co-orientador, o admirável Prof. Dr. Antônio Carlos de Campos Pignatari, o qual deu-me a honra de compartilhar de seus ensinamentos tão referenciados e à equipe do LEMC, representada por Vinícius Gomes de Sales Oliveira e Roberta Cristina Cabral Mingrone, pela forma gentil com que me receberam.

À minha mãe Maria Inês Legramandi Feltrin, tão presente como o amanhecer de cada dia, dando-me força e coragem em todos os momentos, sol do meu caminho, sem a qual nada sou. Minha gratidão é infinita.

Ao meu pai Benedito Feltrin, por ensinar-me com seu próprio exemplo, o amor ao conhecimento e aos livros, através de suas madrugadas de estudo, as quais pude presenciar durante minha infância.

À minha amiga-siamesa Mônica da Silveira, por seu companheirismo, autenticidade e incentivo, atributos sempre presentes nos momentos mais difíceis e críticos, mas também nos mais felizes. Amiga que durante as dificuldades, tornou-se uma irmã.

Ao meu amigo Henrique Bertanha, não somente por toda colaboração, como também por suportar minhas lágrimas, risos e devaneios, sempre trabalhando lado a lado comigo, o qual faz parte de um seleto grupo de pessoas inesquecíveis.

À Fabiana Pegoraro, pela antiga amizade e o compartilhar de tantas experiências, e ainda, por ser um dos pilares de sustentação de minhas ausências no LAC – HEB.

À Danielle Di Flora, que não mediu esforços para que eu pudesse estar liberada para a realização das atividades deste estudo, sempre acreditando no valor de meus sonhos.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Estadual Bauru, por toda colaboração durante minhas ausências e por estarem sempre ao meu lado, compartilhando dos mesmos objetivos e metas.

Ao Hospital Estadual Bauru e Hospital Estadual Manoel de Abreu, representados por sua Diretoria, na pessoa do Dr. Luiz Eduardo Naresse, pela oportunidade de realização do presente estudo e à Coordenadora do Núcleo de Ensino e Pesquisa, Rosilene Cordeiro, um ser humano fantástico que merece todo meu respeito e admiração.

Dedicatória

*Aos meus filhos, Renato Correa Júnior e Rafael Feltrin
Correa, os quais são a herança linda de Deus em minha
vida, maior riqueza que um ser humano pode ter, amo
vocês para sempre.*

*Ao meu esposo Renato Correa, o qual parece ter nascido
para viver lado a lado comigo, acredita e compartilha
dos mesmos sonhos e dedica-se de forma tão abdicada à
nossa família.*

*Aos meus sobrinhos Gabriel Feltrin e Giovana Feltrin,
os quais amo como filhos. Sinto muito orgulho em
participar da história de vida de vocês.*

*Ao meu irmão André Feltrin e à sua esposa Ana Cláudia
Feltrin, pais de coração de meus filhos, conselheiros das
horas difíceis, amigos em todos os momentos.*

*Aos meus avós Maria Jordão Legramandi (in memorian)
e João Legramandi (in memorian), os quais são eternos
pelos ensinamentos de vida que deixaram,
fundamentados na perseverança, na alegria de viver, no
amor e na fé em Deus.*

Epígrafe

*“Morre lentamente quem não troca de idéias, não troca de
discurso, evita as próprias contradições...
Morre lentamente quem vira escravo do hábito, repetindo todos
os dias o mesmo trajeto... Quem não troca de marca, não arrisca
vestir uma cor nova, não conversa com quem não conhece...
Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz no
trabalho, quem não arrisca o certo pelo incerto atrás de um
sonho, quem não se permite, uma vez na vida, fugir dos
conselhos sensatos...
Morre lentamente quem não viaja, quem não lê, quem não ouve
música, quem não acha graça de si mesmo...
Já que não podemos evitar um final repentino, que ao menos
evitemos a morte em suaves prestações, lembrando sempre que
estar vivo exige um esforço bem maior do que simplesmente
respirar...”*

(Poema: A morte devagar – Martha Medeiros)

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução.....	26
1.1. A importância clínica e a resistência à vancomicina.....	27
1.2. <i>Enterococcus</i> spp resistentes à vancomicina: classificação fenotípica.....	30
1.3. Epidemiologia do VRE	31
1.4. Importância do estudo.....	33
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. Casuística e métodos.....	37
3.1. Casuística.....	37
3.2. Locais de estudo.....	38
3.3. Delineamento do estudo.....	39
3.4. Coleta das amostras.....	40
3.5. Cultivo, identificação fenotípica e teste de suscetibilidade dos isolados.....	41
3.5.1. Isolamento e identificação.....	41
3.5.2. Teste de suscetibilidade.....	42
3.6. Tipagem molecular por “Pulsed Field Gel Electrophoresis”.....	43
3.7. Estudo dos fatores de risco e prognóstico	45
3.8. Questões éticas.....	46
4. Resultados.....	48
4.1. Análise microbiológica.....	49
4.2. Incidência de VRE e vigilância hospitalar.....	49
4.3. Análise molecular.....	51
4.4. Estudo dos fatores de risco.....	55
4.5. Prognóstico de colonização ou infecção por VRE.....	65
5. Discussão.....	67
6. Conclusão.....	75
7. Referências bibliográficas.....	78
Anexos.....	85

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

HEB	Hospital Estadual Bauru
HEMA	Hospital Estadual Manoel de Abreu
CID-10	Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde, décima revisão.
CLSI	Instituto de padronização clínica e laboratorial (do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
EUA	Estados Unidos da América
VRE	<i>Enterococcus</i> spp Resistente à Vancomicina (do inglês, <i>Vancomycin-Resistant Enterococcus spp</i>)
VSE	<i>Enterococcus</i> spp Sensível à Vancomicina (do inglês, <i>Vancomycin-Sensitive Enterococcus spp</i>)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
CDC	Centro de prevenção e controle de doenças dos EUA (do inglês, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, (do inglês, <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>).
MIC	Concentração inibitória mínima (do inglês, <i>Minimum inhibitory concentration</i>), relacionado a teste de sensibilidade a antimicrobianos.
MDRO	Do inglês, <i>Multidrug-resistant organisms</i> . Organismos multirresistentes a drogas, refere-se a antibioticoterapia antimicrobiana.
OMS	Organização Mundial de Saúde
CC17	genogrupo de <i>Enterococcus faecium</i> , designado complexo clonal 17
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>).
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do estudo dividindo os grupos em HEB, HEMA e EXTERNO.....	39
Figura 2. PFGE: confecção de “plugs” contendo as células de <i>Enterococcus spp</i> em agarose low melting à 1%.....	44
Figura 3. Esquema de distribuição dos casos de VRE como “importados” e “autóctones”.....	48
Figura 4. Número de pacientes com VRE por unidade hospitalar.....	50
Figura 5.a. Número de isolados por 10.000 pacientes-dia do HEB.	50
Figura 5.b. Número de isolados por 10.000 pacientes-dia do HEMA.....	51
Figuras 6 a e b. Tipagem molecular de VRE por técnica de PFGE.....	51
Figura 7. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics Applied Maths) de VRE isolados de <i>E. faecalis</i>	52
Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics Applied Maths) de VRE isolados <i>E. faecium</i>	53
Figuras 9.a, b e c . Boxplot com comparação de mediana e variação (IQ) da idade (a),do índice de comorbidades de Charlson	56

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos pacientes incluídos no estudo.....	38
Tabela 2. Tabela utilizada para identificação dos isolados do Kit para identificação de <i>Enterococcus</i> spp®(Probac do Brasil).....	42
Tabela 3. Distribuição dos clones de VRE, tipados por PFGE, entre HEB e HEMA.....	54
Tabela 4. Análise univariada da distribuição dos possíveis fatores de risco para infecção e/ou colonização por VRE entre o HEB e o HEMA.....	57
Tabela 5. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por VRE.....	58
Tabela 6. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por VRE no HEB.....	59
Tabela 7. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por VRE no HEMA.....	60
Tabela 8. Análise dos fatores de risco para aquisição de cepas de VRE formadoras de “cluster”.....	62
Tabela 9. Análise dos fatores de risco para aquisição de cepas de VRE do Tipo <i>Afm</i> da tipagem PFGE.....	63
Tabela 10. Análise dos fatores de risco para aquisição de cepas de <i>E.faecalis</i> resistentes à vancomicina.....	64
Tabela 11. Análise do prognóstico da infecção ou colonização por VRE	65

Resumo

Resumo

Antes da emergência da resistência à vancomicina, *Enterococcus* spp não eram considerados patógenos de grande risco para pacientes submetidos a cuidados em saúde. Estas bactérias raramente causavam infecções sistêmicas e eram isoladas principalmente de infecções urinárias. Atualmente, são considerados uma grande ameaça no ambiente hospitalar, devido à emergência dos enterococos resistentes à vancomicina (*Vancomycin-resistant enterococci*, VRE).

Nosso estudo pretendeu abordar de forma ampla a epidemiologia, os fatores de risco, a clonalidade e o prognóstico da aquisição de VRE em dois hospitais consorciados: O Hospital Estadual Bauru (HEB) e o Hospital Estadual Manuel de Abreu (HEMA), ambos pertencentes à Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Para tanto, combinamos metodologias de epidemiologia clássica e molecular. O período de coleta de isolados foi de janeiro de 2010 a junho de 2012, correspondendo à época de emergência e disseminação dos VRE nos hospitais do estudo. Foram incluídos 122 sujeitos que adquiriram VRE em um dos hospitais, e 8 casos classificados como importados (isto é, procedentes de outros serviços de saúde). Os isolados eram procedentes de culturas clínicas (solicitadas pelos médicos responsáveis) ou de vigilância (*swabs* retais coletados sob orientação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar). Foram caracterizados por métodos usuais de identificação de espécie e antibiograma. Todos foram submetidos a tipagem molecular por Eletroforese de Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), utilizando a enzima de restrição *smaI*.

Foram realizados estudos caso-controle (com análise multivariada), excluindo os sujeitos que adquiriram VRE em outros serviços. Para os 122 casos remanescentes, foram selecionados 244 controles, nos quais o VRE não foi identificado.

Dentre os casos identificados nos hospitais do estudo, 113 (86,9%) foram caracterizados como *Enterococcus faecium* e 17 (13,1%) como *Enterococcus faecalis*. Ao todo, 88(67,7%) foram identificadas no HEB e 42(32,7%) no HEMA. A autoctonia foi comprovada em 77(87,5%) dos casos do HEB e 41(97,6%) dos casos do HEMA. A tipagem por PGFE revelou que 94(77,0%) das cepas foram formadoras de “clusters” (definidos como perfis eletroforéticos agrupando cinco ou mais isolados). Também identificamos que 47(38,5%) pertenceram ao “cluster” *Afm*. De forma geral, os fatores de risco para infecção e/ou colonização por VRE foram o uso de ventilação mecânica (OR=8,12; IC95% 1,76-37,54;

$p=0,007$) e a terapêutica antimicrobiana com piperacilina-tazobactam (OR=3,62; IC95% 1,62-8,40; $p=0,002$); cefepime (OR=2,96; IC95% 1,51-5,82; $p=0,002$); e imipenem (OR=3,81; IC95% 1,57-9,24; $p=0,003$).

De forma isolada, os casos do HEB apresentaram como fatores de risco o uso de esteroides (OR=2,41; IC95% 1,11-5,23; $p=0,03$), de ventilação mecânica (OR=6,03; IC95% 1,23-29,47; $p=0,03$) e a terapêutica antimicrobiana com cefepime (OR=2,77; IC95% 1,12-6,84; $p=0,03$) e imipenem (OR=2,41; IC95% 1,11-5,23; $p=0,03$). Para aqueles que adquiriram VRE no HEMA somente o uso da oxacilina (OR=35,27; IC95% 2,46-505,37; $p=0,01$) foi identificado como fator de risco.

Realizamos novas análises, para identificar fatores relacionados à aquisição de *E. faecalis* (versus *E. faecium*) e à aquisição de isolados participantes de clusters.

Na primeira etapa, observamos relação entre uso de levofloxacino e aquisição de *E. faecalis* (OR=14,87; IC95% 3,04-72,75; $p=0,001$).

De forma interessante, identificamos uma tendência significativa a não pertencer a “clusters” entre pacientes do sexo masculino (OR=0,34; IC95% 0,12-0,94; $p=0,04$), portadores de doença cardíaca (OR=0,31; IC95% 0,11-0,91; $p=0,03$), ou aqueles que fizeram uso de amoxicilina-clavulanato (OR=0,24; IC95% 0,09-0,69; $p=0,008$).

Por outro lado, houve associação independente entre carregamento do clone dominante *Afm* e internação em uma enfermaria específica do HEB (Terceiro Andar, Esquerdo; OR=3,91; IC95% 1,04-14,72; $p=0,04$), e com traqueostomia ($p=0,02$; OR=8,04; IC95% 1,41-45,95), ventilação mecânica (OR=14,34; IC95% 1,59-129,77; $p=0,02$) e uso de antifúngicos (OR=9,99; IC95% 1,24-80,20; $p=0,03$).

Quanto ao prognóstico, o óbito não foi influenciado pela presença do VRE (infecção ou colonização), mas sim, pelas comorbidades, os fatores de gravidade e o uso de dispositivos invasivos.

Embora a predominância de casos autóctones demonstre que as medidas de controle não impediram a disseminação do VRE, este manteve uma baixa circulação. A presença de cepas que pertencem a um mesmo “cluster” em ambas as instituições, confirma a existência de disseminação entre as mesmas. O HEB apresentou uma maior tendência à “clusterização” e a maior transmissão cruzada do clone *Afm* ocorreu no terceiro andar esquerdo.

Medidas para evitar a transmissão cruzada de VRE e do desenvolvimento endógeno de resistência nas enfermarias e nas UTI's dos hospitais deste estudo, não somente devem, como

já fazem parte de uma política constante de controle, que inclui o monitoramento da colonização assintomática por VRE e auditoria restritiva de prescrição de antimicrobianos.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular; fatores de risco; *Enterococcus spp* resistentes à vancomicina; VRE.

Abstract

Abstract

In the decades that preceded the emergence of vancomycin resistance, *Enterococcus* spp. were not considered pathogens of greatest risk for patients undergoing health care. These bacteria rarely caused systemic infections and were isolated mainly from urinary tract infections. Presently, they are considered a major threat in hospitals due to the emergence of vancomycin-resistant Enterococci (VRE).

Our study sought to provide a wide evaluation of the epidemiology, risk factors, clonality and outcome of VRE colonization/infection in two hospitals from a public health consortium: Hospital Estadual Bauru (HEB) and Hospital Estadual Manuel de Abreu (HEMA) Hospital, both belonging to São Paulo State Health Secretariat.

We combined classic epidemiological methods and molecular epidemiology. The study period extended from January 2010 through June 2012, corresponding to the time of emergence and spread of VRE in hospitals in the study. We included 122 subjects who acquired VRE in one of the study hospitals, and 8 cases classified as imported (i.e., who acquired VRE in other health services). The isolates were obtained from clinical cultures (requested by attending physicians) or surveillance cultures (rectal swabs collected under the guidance of the Committee on Hospital Infection Control). VRE were characterized by the usual methods of species identification and antibiotic susceptibility. All isolates were subjected to molecular typing using Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) using the restriction enzyme *Sma*I.

Case-control studies (with multivariable analysis) were performed excluding subjects who acquired VRE in other services. For the remaining 122 cases, 244 controls were selected, in which VRE was not identified.

Among the cases from the study hospitals, 113 (86.9%) were identified as *Enterococcus faecium* and 17 (13.1%) as *Enterococcus faecalis*. Overall, 88 (67.7%) were isolated in HEB and 42 (32.7%) in HEMA. The autochthony was confirmed in 77 (87.5%) of HEB cases and 41 (97.6%) cases from HEMA. The PFGE by typing revealed that 94 (77.0%) strains belonged to clusters (arbitrarily defined as electrophoretic profiles grouping five or more isolates). We also found that 47 (38.5%) belonged to the cluster *Afm*. For overall VRE, risk

factors were the use of mechanical ventilation (OR = 8.12 , 95% CI=1.76 to 37.54 , p = 0.007) and antimicrobial therapy with piperacillin - tazobactam (OR = 3.62 , 95%CI=1.62 to 8.40, p = 0.002 ;) , cefepime (OR = 2.96 , 95%CI=1.51 to 5.82 , p = 0.002 ;) and imipenem (OR =3.81 , 95%CI=1.57 to 9.24 , p = 0.003) .

In subgroup analysis, the cases from HEB presented as risk factors steroid use (OR = 2.41 , 95%CI=1.11 to 5.23 , p = 0.03) , mechanical ventilation (OR = 6.03 , 95% CI 1.23 to 29.47 , p = 0.03) , use of cefepime (OR = 2.77 , 95% CI=1.12 to 6.84 , p = 0.03) or imipenem (OR = 2.41 , 95% CI=1.11 to 5.23 , p = 0.03) . For those who acquired VRE in HEMA only the use of oxacillin (OR = 35.27 , 95% CI=2.46 to 505.37 , p = 0.01) was identified as a risk factor .

We conducted further analyzes to identify factors related to the acquisition of *E. faecalis* (as opposed to *E. faecium*) and the acquisition of isolates belonging to cluster.

In the first step, we identified association between the use of levofloxacin and acquisition of *E. faecalis* (OR = 14.87 , 95% CI 3.04 to 72.75 , p = 0.001) .

Interestingly, we identified a significant tendency not belong to clusters among male patients (OR = 0.34 , 95%CI=0.12 to 0.94,p=0.04) , patients with heart disease (OR = 0.31 , 95% CI=0.11 to 0.91, p=0.03) , or those who made use of amoxicillin - clavulanate (OR = 0.24 , 95% CI=0.09 to 0.69, p=0.008) .

On the other hand, there was an independent association between entrainment of the dominant clone Afm and hospitalization in a specific ward of HEB (Left ward of Third Floor, OR = 3.91 , 95% CI=1.04 to 14.72 , p = 0.04) , and tracheostomy (p = 0.02 , OR = 8.04 , 95% CI 1.41 to 45.95) , mechanical ventilation (OR = 14.34 , 95% CI=1.59 to 129.77 , p = 0.02) or use of antifungal (OR = 9.99 , 95% CI=1.24 to 80.20 , p = 0.03)

As for the outcome, death was not influenced by the presence of VRE (infection or colonization), but by comorbidities, severity factors and the use of invasive devices.

Although the predominance of autochthonous cases demonstrate that the control measures have not prevented the spread of VRE, its incidence remained a low during the study period. The presence of similar clones in both institutions confirms the existence of the spread

between them. Cases from HEB presented a greater tendency to clustering and to cross-transmission of clone *Afm*, especially on the ward from the left third floor.

Measures to prevent cross-transmission of VRE and endogenous development of resistance in the wards and ICUs of the study hospitals, should includes monitoring of asymptomatic colonization with VRE and restrictive audit of antibiotic prescribing. Those measures are already implemented in those hospitals.

Keywords: Molecular epidemiology, risk factors, vancomycin-resistant *Enterococcus spp*; VRE .

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os *Enterococcus* spp são encontrados no solo, nos alimentos, na água, em plantas, animais, pássaros e insetos. Em humanos e em outros animais, são comensais da cavidade oral, do trato gastrointestinal e do trato geniturinário feminino. Exibem ainda uma boa capacidade de adaptação a ambientes ecologicamente complexos, polimicrobianos, ricos em nutrientes e com baixo teor de oxigênio^{1,2}. Tais microrganismos representam 1% da microbiota intestinal humana³, juntamente com cerca de 450 outras espécies de bactérias aeróbias e anaeróbias⁴.

Quando às suas características fisiológicas, os *Enterococcus* spp crescem em temperaturas entre 10°C e 45°C, em 6,5% de NaCl (cloreto de sódio) e hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares^{1,5}. Uma característica importante dos *Enterococcus* spp é o fato de que são capazes de sobreviver em temperaturas extremas e sob a ação de desinfetantes químicos como o glutaraldeído, cloro e álcool, o que é um dado que ajuda a explicar a sua sobrevivência e disseminação nos hospitais^{6,7}.

Inicialmente, os enterococos foram descritos como integrantes do gênero *Streptococcus* do grupo D de Lancefield. Com base em características fisiológicas e genéticas, a partir de 1984 foram reclassificados em um novo gênero conhecido como *Enterococcus* spp que atualmente contém 51 espécies. Entretanto, apenas poucas espécies são reconhecidas como importantes patógenos humanos⁸.

Existem estudos taxonômicos atuais que mostram a existência de 51 espécies, membros do gênero *Enterococcus*. Contudo, apenas poucas espécies são reconhecidas como importantes patógenos humanos. O *Enterococcus faecalis* é o isolado mais frequente e está associado com 80% a 90% das infecções enterocócicas humanas. *Enterococcus faecium* é o segundo isolado mais frequente, sendo encontrado em 10% a 15% das infecções³.

Mais de 90% das cepas de *Enterococcus* spp produzem o antígeno lipoteicóico do grupo D de Lancefield na parede celular, o qual pode ser indicado como um fator de virulência por induzir a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e interferon, levando à modulação da resposta imune. Algumas cepas de *Enterococcus faecalis* aparentemente produzem uma bacteriocina de 7,4 kDa, codificada por plasmídeos, denominada AS-48, que possui atividade lítica para um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Algumas cepas de *E. faecalis* elaboram diversas enzimas extracelulares, como gelatinase e hialuronidase⁸.

Certas cepas de *E. faecalis* e de *E. faecium* produzem uma citolisina que atua como hemolisina frente a eritrócitos de humanos, coelhos, cavalos e bovinos (exceto de carneiros), a qual é tóxica para alguns tipos de células eucarióticas. As cepas de *E. faecalis* produzem feromônios que são pequenos peptídeos capazes de aproximar células doadoras e receptoras para a transferência de DNA plasmidial por conjugação. Também parece que essas moléculas podem atuar como quimiotáticas para os neutrófilos, o que colabora com o aumento da resposta inflamatória à infecção⁸.

A substância de agregação, é uma proteína de superfície feromônio-induzível, codificada por um plasmídeo, responsável pela aglutinação dos microorganismos para facilitar a troca. Acredita-se que, em modelo experimental de endocardite, essa substância atue na aderência dos *Enterococcus* spp às células dos epitélios intestinais e renais, assim como às células cardíacas. A substância de agregação também aumenta a sobrevivência dos *Enterococcus* spp nas vesículas lisossomais de células fagocíticas⁹.

1.1.A importância clínica e a resistência à vancomicina

Inicialmente, os *Enterococcus* spp foram considerados patógenos de pouca importância clínica. Raramente causavam infecções sistêmicas, sendo isolados principalmente de infecções urinárias¹⁰, pois são habitantes normais do trato gastrointestinal e biliar e, em menor proporção, da vagina e da uretra masculina⁸. Porém, nas últimas décadas, as infecções sistêmicas enterocócicas estão aumentando gradativamente. Os enterococos são hoje considerados uma das maiores ameaças no ambiente hospitalar, principalmente, os que mostram resistência à vancomicina¹⁰.

O impacto clínico mais comum de enterococos resistentes à vancomicina é a colonização intestinal, o que não resulta em sintomas, pode durar por longos períodos e serve como um reservatório para a transmissão de VRE (*Enterococcus* spp resistente à vancomicina, do inglês, *vancomycin-resistant enterococci*) em outros pacientes. Certos pacientes colonizados por VRE estão em risco de infecção, incluindo pacientes de hematologia e oncologia, os doentes nas UTI (unidade de terapia intensiva) e receptores de órgãos transplantados (especialmente abdominal)¹¹.

Embora a literatura indique a urina como a fonte mais comum para isolamento de enterococos, no surto descrito por Zanella *et al*, a secreção traqueal foi o fonte mais frequente de VRE (36%) mesmo considerando que esses microorganismos tenham sido isolados de várias outras amostras de pacientes, como urina, sangue, cateteres, ferida, outros fluidos, sugerindo uma maior taxa de disseminação¹².

Ao considerarmos os fatores de risco, a UTI foi o principal serviço de onde o VRE foi isolado. Pacientes internados em tais unidades, são considerados de alto risco para aquisição de VRE, pois, muitas vezes, são altamente expostos aos agentes antimicrobianos e às terapias de suporte invasivo e ainda, muitos recebem esquemas de drogas imunossupressoras^{12,13}.

Quanto ao desenvolvimento de bacteremias por VRE, os fatores de risco relatados em estudos prévios incluem imunossupressão e debilidade, as quais são causadas por prematuridade, diabetes, tumor maligno e infecções de localização profunda (p.ex., úlceras por decúbito com infecções secundárias), instrumentações do trato gastrointestinal, geniturinário ou respiratório, hospitalização prolongada e uso de antimicrobianos de amplo espectro, mesmo aqueles com pouca ou nenhuma ação contra enterococos (p.ex., cefalosporinas)¹².

Um fato interessante é que as infecções enterocócicas têm recebido muita atenção após o surgimento de isolados resistentes aos antibióticos glicopeptídicos. No entanto, os VRE são patógenos nosocomiais incomuns na Europa, onde têm sido isolados da pecuária, pequenos animais e pessoas saudáveis. Isto é atribuído ao fato de que em alguns países europeus, o uso de um promotor de crescimento animal de natureza antimicrobiana: a avoparcina, um glicopeptídeo. Esse uso gerou um ambiente propício para o surgimento do VRE na comunidade. O fato de que os VRE hospitalares europeus tenham migrado da comunidade faz com que sejam menos propensos a ser multirresistentes (ou seja, a demonstrar resistência a outras classes de antimicrobianos), e a apresentar menor concentração espacial nos hospitais (sugerindo predomínio de aquisição endógena sobre a transmissão cruzada)¹¹. Em contraste, o reservatório da comunidade parece estar ausente nos EUA (Estados Unidos da América), onde os VRE representam um problema alarmante nos hospitais³.

A resistência dos enterococos a diversos agentes antimicrobianos parece contribuir (direta ou indiretamente) para a gravidade das infecções, e certamente dificultam seu tratamento. Esses microorganismos apresentam resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos e lincosamidas. As CIM's (concentrações inibitórias mínimas) de penicilina

e cefalosporinas são relativamente elevadas e ainda, são resistentes à ação das sulfonamidas *in vivo*. As CIM's relativamente altas de agentes β -lactâmicos devem-se à menor afinidade das proteínas da parede celular, que se ligam à penicilina, enquanto que a resistência de baixo nível para aminoglicosídeos é atribuída à menor penetrabilidade na parede celular dos enterococos. Apesar de os enterococos parecerem sensíveis a sulfonamidas *in vitro*, *in vivo* são capazes de superar o bloqueio da síntese de folatos⁸.

Como *E. faecium* é naturalmente mais resistente aos antimicrobianos e possui maior facilidade para adquirir novos genes de resistência, quando comparado às outras espécies, a frequência de isolamento deste microrganismo está aumentando significativamente¹⁰.

Até princípios da década de 1980, a sensibilidade dos enterococos à penicilina e à vancomicina era completamente previsível. A partir dessa época, tornou-se crescente o número de publicações sobre espécies de *Enterococcus* resistentes à ampicilina ou à vancomicina e demonstrou-se que a resistência de certas cepas de *E. faecalis* à ampicilina é devida à produção de β -lactamases⁸.

Antes do final dos anos 1970, havia pouco uso clínico da vancomicina nos EUA. Posteriormente, com a identificação de *Clostridium difficile* como uma das causas de diarreia e com o aumento da prevalência da resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* coagulase-negativo, o uso de vancomicina oral e intravenosa, respectivamente, aumentaram drasticamente, provavelmente contribuindo para o surgimento de VRE, por volta de 1986 a 1988, especialmente nos EUA^{7,11}.

De acordo com o CDC (centro de prevenção e controle de doenças dos EUA, do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*), de 1989 a 1993, o percentual de infecções nosocomiais causadas por VRE aumentou de 3% para 7,9%, um aumento significativo em quatro anos. A maioria dos VRE reconhecidos nos EUA, em torno de 95%, são da espécie *E. faecium*^{7,13}. Segundo os dados do CVE-SP (Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo), entre os anos de 2004 a 2011, 3,1% das hemoculturas de pacientes de UTI's de hospitais do Estado de São Paulo apresentaram positividade para VSE (*Enterococcus* spp sensíveis à vancomicina) e 1,3% foram positivas para VRE, ou seja, 29,5% dos isolados de *Enterococcus* spp, recuperados de pacientes nas condições e no período supracitados, foram resistentes à vancomicina⁵². Gales *et al*, em um levantamento realizado entre os hospitais brasileiros participantes do Programa SENTRY,

encontraram que 15,4% dos *Enterococcus* spp dos hospitais brasileiros são resistentes à vancomicina⁵³.

A aquisição de resistência à vancomicina por enterococos multiresistentes (ou seja, resistentes à ampicilina e aminoglicosídeos) nos EUA resultou no surgimento do VRE, onde os *Enterococcus faecium* foram a espécie predominante que se espalhou nosocomialmente e, em alguns casos, resultaram em infecções intratáveis¹¹

A resistência à vancomicina também pode ser intrínseca em determinadas espécies menos comuns de enterococos, resultando em baixo nível de resistência à vancomicina, mas com sensibilidade para teicoplanina. O gene *vanC* ligase, que codifica este tipo de resistência, não são adquiridos ou transferíveis¹⁴.

A resistência adquirida à vancomicina pelo enterococos também está associada a alterações da parede celular (modificação dos precursores de parede bacteriana impedindo a ligação da droga ao seu sítio de ação) algumas vezes por plasmídeo ou mediadas por cromossomo^{7, 15}.

1.2. *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina: classificação fenotípica

O aparecimento de cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina demonstrou importantes modificações nas espécies de VRE, estes foram divididos em fenótipos de resistência, sendo *VanA*, *VanB* e *VanC*, os mais frequentes. Os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* que possuem genótipo *vanA* mostram resistência de alto nível e indutível, sendo esta característica mediada por *transposons*, tanto para vancomicina (CIM superiores a 64 µg/ml) quanto para teicoplanina (CIM de 16 µg/ml ou maior), ambos agentes antimicrobianos glicopeptídicos. O grupo de genes *vanA* codifica uma D-alanina-D-alanina ligase que sintetiza precursores de glicopeptídeo com afinidade reduzida para vancomicina e teicoplanina⁸.

As cepas com genótipo *vanB* têm resistência adquirida indutível a diversas concentrações de vancomicina, mas permanecem sensíveis à teicoplanina, embora raras cepas possam ser resistentes a este último antimicrobiano. Os isolados que expressam o genótipo *vanB* também incluem cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*^{7, 8}.

Os isolados com genótipo *vanC* mostram resistência intrínseca, constitucional, de baixo nível à vancomicina e são sensíveis à teicoplanina. Os enterococos com fenótipo *VanA*

são os mais preocupantes, por serem capazes de transferir, mediante mecanismos de conjugação, os marcadores de resistência *vanA* a outros enterococos e microorganismos gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus*. Entretanto, em 1993 e 1994, verificou-se que cepas com genótipo *vanB* também eram capazes de transferir seus genes de resistência à vancomicina⁸.

Dentre os seis fenótipos de resistência a vancomicina reconhecidos (*VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE* e *VanG*), cinco deles correspondem à resistência adquirida (*VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanE* e *VanG*); um tipo, o *VanC*, é característico de *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, corresponde à resistência intrínseca e é caracterizado pelo baixo nível de resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina¹⁶.

O CDC recomenda precauções de isolamento de contato em pacientes colonizados ou infectados com VRE, sem mencionar precauções específicas de *Enterococcus* spp expressando o genótipo *vanC*, os quais são comuns na Europa, no entanto, são raros nos EUA¹³.

A questão é que os VRE são geneticamente diferentes e os surtos nosocomiais podem ser monoclonais, oligoclonais ou policlonais; certos clones podem estabelecer-se como cepas endêmicas. A epidemiologia molecular do VRE dentro de cada instituição pode mudar ao longo do tempo¹¹.

1.3. Epidemiologia do VRE

O aumento de infecções nosocomiais causadas por VRE, de 0,3% para 7,9%, entre 1989 e 1993 nos EUA, foi causado principalmente pela transmissão de infecções por VRE entre pacientes internados em unidades de terapia intensiva, embora possa ser observado em pacientes de enfermarias. O aparecimento de VRE levou a múltiplas epidemias e surtos em vários hospitais¹⁶.

Os primeiros VREs brasileiros foram isolados no Paraná (1996) e São Paulo (1997), expressavam os fenótipos *VanD* e *VanA*, respectivamente. Depois disso, VREs foram detectados em hospitais de várias cidades, incluindo São Paulo, Marília, Rio de Janeiro, Uberlândia, e Porto Alegre. Devido às dimensões geográficas do Brasil, era de se esperar que cada estado tivesse isolado VRE em momentos diferentes³.

Zanella *et al* relataram o primeiro *E.faecium* VanA no Brasil, o qual foi isolado em São Paulo, em junho de 1997, de um paciente com meningite. Nesse mesmo hospital, a partir de maio de 1998, novas cepas de VRE foram detectadas, indicando um surto hospitalar causado por *Enterococcus* spp VanA^{12, 17}.

Até o início de 1990, o *E. faecalis* era predominante nas espécies isoladas nos hospitais dos EUA, em 2008, com a proporção nosocomial de cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* de 1,5:1. No entanto, houve um aumento importante na incidência de infecções nosocomiais por *E. faecium* após o aparecimento da resistência à vancomicina. Além disso, atualmente, mais de 80% de isolados de *Enterococcus* spp recuperados dos hospitais dos EUA são *E. faecium* e 90% destes, apresentam resistência à vancomicina. Ao contrário, a prevalência da resistência a vancomicina em *E. faecalis* permanece baixa (7% dos isolados), e resistência a ampicilina continua sendo extremamente rara. Esta mudança na epidemiologia de infecções por *Enterococcus* spp tem sido atribuída ao aumento na capacidade do genogrupo de *E. faecium*, designado complexo clonal 17 (CC17), em colonizar o trato gastrointestinal de humanos, causar doença, e exibir altos níveis de resistência a antibióticos antienterococos¹⁸.

A transmissão cruzada de organismos multirresistentes a drogas (*Multidrug-resistant organisms*, MDRO), muitas vezes, através das mãos por cuidados de profissionais de saúde, tem sido o fator mais frequentemente responsável pelo aumento da incidência e prevalência de MDRO, especialmente de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*Methicillin-resistant S. aureus*, MRSA) e VRE. Entre as muitas espécies de MDRO, os *Enterococcus* emergiram de forma cada vez mais importante, como um patógeno nosocomial e adquirido na comunidade¹⁹.

Dados recentes sugerem que a epidemiologia do VRE está mudando tanto nos EUA como na Europa, com a disseminação desses organismos na comunidade nos EUA e em alguns países europeus com a presença de emergentes “enterococos muito resistentes” em hospitais¹¹.

Embora seja difícil prevenir e controlar as infecções enterocócicas, o uso racional de antibioticoterapia e a implementação de medidas adequadas de controle de infecção podem reduzir o risco de colonização por estas bactérias¹⁵.

D'Azevedo *et al* identificaram em seu estudo uma grande diminuição no número de amostras positivas para VRE (de 49,4% para 9,7%) após a aprovação das medidas de controle de infecção²⁰.

1.4. Importância do estudo

A introdução dos VRE em hospitais brasileiros se deu de forma gradual e desigual. Como seria esperado, os primeiros relatos foram feitos em grandes centros urbanos. No entanto, em um Estado como São Paulo, diversas cidades do interior apresentam importante desenvolvimento econômico e albergam hospitais que prestam assistência de alta complexidade.

Não estão disponíveis dados sobre a epidemiologia do VRE nos diversos hospitais de Bauru e dos municípios adjacentes. Até onde alcança o conhecimento dos autores do presente trabalho, somente o Hospital Estadual Bauru (e o serviço associado, Hospital Manoel de Abreu) realizam de forma rotineira busca ativa para colonização por VRE através da coleta rotineira de *swabs* de reto e dessa forma foram identificados todos os casos até o momento.

A importância deste estudo está fundamentada especificamente no fato da realização de uma detalhada da análise epidemiológica **no momento de introdução (emergência)** desse patógeno nos hospitais avaliados.

Portanto, o presente trabalho exibiu uma somatória de técnicas epidemiológicas clássicas (como o estudo de caso-controle), ferramentas de fenotipagem e de tipagem clonal, as quais identificaram as cadeias de transmissão, os fatores de risco e o prognóstico da colonização ou infecção por VRE.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a epidemiologia, os fatores de risco e o prognóstico da colonização ou infecções nosocomiais por *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina (*Vancomycin-resistant Enterococci*, VRE) em pacientes de dois hospitais públicos consorciados no município de Bauru.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar incidência de casos autóctones e importados de VRE no Hospital Estadual Bauru (HEB) e Hospital Estadual Manoel de Abreu (HEMA).
- ✓ Identificar fatores de risco para colonização ou infecção por VRE nos hospitais do estudo. Analisar a relação entre os dados demográficos, dados de internação, comorbidades e o uso de antimicrobianos com a ocorrência de colonização ou infecção por VRE.
- ✓ Identificar fatores associados com a espécie de VRE envolvida nos casos de colonização/infecção (*E. faecalis* versus *E. faecium*).
- ✓ Realizar a caracterização de clones de VRE por metodologia molecular e identificar fatores associados à disseminação por transmissão cruzada nas instituições, caracterizada pelo agrupamento em *clusters*.
- ✓ Determinar o impacto da colonização por VRE sobre a mortalidade de pacientes internados nos hospitais do estudo.

Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado combinando de ferramentas epidemiológicas clássicas de estudo de caso-controle com métodos de caracterização molecular de isolados.

Foi um estudo retrospectivo, somente foi possível pelo fato de que todos os isolados de VRE (de origem clínica ou de vigilância epidemiológica) terem sido armazenados em banco, com o objetivo de garantir a rastreabilidade dos isolados de VRE da instituição. Para isso, foram congelados a -20°C, em caldo TSB (Caldo Triptcaseína de Soja, do inglês, *Trypticase Soy Broth*) com 20% de glicerol

Após a identificação do primeiro isolado de VRE, na urina de um paciente da UTI de adultos do HEB (Hospital Estadual Bauru), em 16 de janeiro de 2013, foram coletados *swabs* retais de vigilância de todos os pacientes internados no hospital supracitado. Após o primeiro levantamento epidemiológico de vigilância, a SCIH (serviço de controle de infecção hospitalar) instituiu uma rotina de investigação da colonização por VRE, conforme descrito no item 3.4 desta dissertação.

3.1.Casuística

Foram incluídos 137 pacientes, dos quais foram isoladas cepas de VRE através de culturas clínicas ou de vigilância, no período de janeiro de 2010 a junho de 2012. Não houve restrição quanto a gênero, idade ou comorbidades.

Alguns pacientes necessitaram ser excluídos por motivos diversos como: pertencer a instituição não participante do estudo (2 pacientes), duplicidade na inclusão (2 pacientes) e por fim, a não recuperação do isolado para a realização da tipagem molecular (3 pacientes), totalizando a exclusão de 7 pacientes, de forma que a casuística se constituiu em 130 indivíduos.

Foram selecionados 2 “pacientes-controle” para cada “caso” e os critérios de seleção para os controles foram: que tenha sido submetido ao mesmo serviço e ambiente que o “caso”, tanto durante a admissão, quanto no período de internação, sempre que possível. Desta forma a amostra totalizou a inclusão de 374 pacientes, demonstrados na **tabela 1**.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes incluídos no estudo, de acordo com a procedência e sua classificação como caso ou controle.

Grupo	Casos	Controles	Total
HEB	78	156	234
HEMA	44	88	132
EXTERNOS	8	0	8
TOTAIS	130	244	374

Obs: HEB, Hospital Estadual Bauru; HEMA, Hospital Estadual Manoel de Abreu; EXTERNOS, pacientes transferidos de outros serviços. Pacientes externos não foram incluídos no estudo caso-controle.

Quanto ao estudo de caso-controle, detectamos a necessidade da exclusão dos pacientes que pertenciam ao grupo designado como EXTERNO, pois entendemos que teríamos uma falha grave no que diz respeito à seleção dos controles, pois não poderíamos selecioná-los de forma fidedigna visto que não tínhamos acesso aos serviços externos dos quais eram oriundos. Portanto, o estudo de caso-controle incluiu 122 pacientes como “casos” (78 do grupo HEB e 44 do grupo HEMA), e ainda, 244 pacientes como “controles”.

3.2. Locais de estudo

Este estudo foi realizado em dois hospitais públicos, o HEB, com 289 leitos, dos quais 31 leitos são da UTI (unidade de terapia intensiva) e o HEMA com 57 leitos, sendo 21 leitos destinados à clínica médica, 10 leitos ao tratamento de dependentes químicos e 26 leitos para a especialidade em Infectologia. Ambos são administrados por uma Organização Social de Saúde (OSS), a Fundação para o Desenvolvimento Médico e Hospitalar (FAMESP), localizados no município de Bauru, estado de São Paulo.

Por se tratarem de hospitais consorciados, tais instituições compartilham a mesma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). Esta, recomenda a coleta de culturas de vigilância (*swabs* retais) à admissão para todos os pacientes com história de internação prévia em outro serviço e semanalmente, para aqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva. Além disso, monitora os resultados de exames microbiológicos solicitados pelos médicos assistentes (culturas clínicas).

3.3. Delineamento do estudo

Os pacientes dos quais foram isoladas as cepas de VRE constantes neste estudo foram divididos em 3 grupos (**figura 1**):

O **Grupo HEB** foi formado por pacientes do Hospital Estadual Bauru (HEB) que apresentaram a primeira cultura positiva para VRE com tempo de internação superior a 48 horas ou do HEB transferidos para o Hospital Estadual Manoel de Abreu (HEMA) com tempo de internação inferior a 48 horas.

O **Grupo HEMA** foi formado por pacientes do HEMA que apresentaram a primeira cultura positiva para VRE com tempo de internação superior a 48 horas ou do HEB transferidos do HEMA com tempo de internação inferior a 48 horas.

O **Grupo EXTERNOS** foi formado por pacientes do HEB ou do HEMA que apresentaram a primeira cultura positiva para VRE com tempo de internação inferior a 48 horas transferidos de outros serviços.

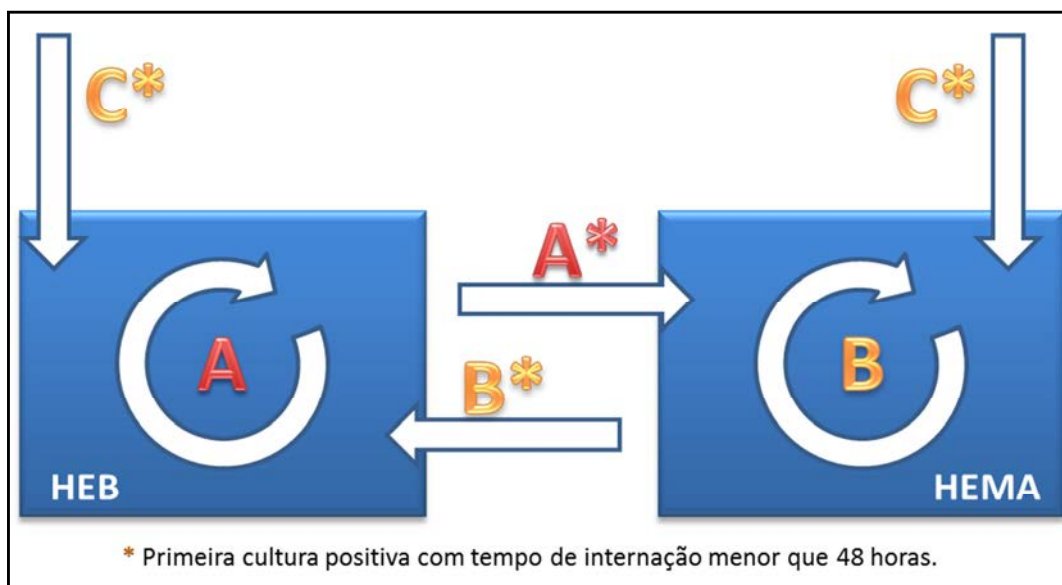


Figura 1. Esquema do estudo dividindo os grupos em A, HEB (Hospital Estadual Bauru); B, HEMA (Hospital Estadual Manoel de Abreu) e C, EXTERNO (formado por pacientes transferidos de outros serviços).

3.4. Coleta das Amostras

As amostras de pacientes designados como “casos”, dos quais foram obtidos os isolados de VRE, foram principalmente coletadas através de *swabs* retais para triagem de vigilância do HEB (Hospital Estadual Bauru) e HEMA (Hospital Estadual Manoel de Abreu) e de amostras clínicas de pacientes infectados, oriundas de urina, sangue e secreção traqueal.

A coleta de *swabs* de vigilância seguiram os seguintes critérios: coleta periódica semanal de todos os pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI). Nas enfermarias foram investigados pacientes contactantes daqueles que apresentaram positividade em culturas de vigilância ou ainda, foram coletados *swabs* de vigilância de pacientes oriundos de outros serviços, com transferência imediata, no momento da admissão.

A técnica de coleta dos *swabs* retais incluíram a umidificação do *swab* estéril com solução fisiológica a 0,9% (técnica estéril) e introdução no esfíncter retal do paciente, fazendo movimentos rotatórios. Ao retirar o *swab*, certificamo-nos de que existia coloração fecal no algodão e o mesmo foi inserido em meio *Stuart* e transportado para o Laboratório Clínico do Hospital Estadual Bauru, ao setor de microbiologia, onde foi realizada a semeadura microbiológica.

As uroculturas foram colhidas a partir de solicitação do médico assistente, obtidas da coleta de jato médio (desprezando-se o primeiro e o último jato urinário) da primeira urina da manhã, ou com êxtase urinária mínima de duas horas de forma asséptica.

A obtenção das amostras destinadas à realização das hemoculturas seguiram antissepsia das mãos com clorexidine degermante ou álcool gel, instalação do torniquete no braço do paciente, seleção de uma veia adequada, desinfecção a área da punção com álcool 70%, antissepsia com clorexidine alcoólica e punção venosa asséptica. Os frascos utilizados para a coleta das hemoculturas pertenciam ao sistema automatizado Biomerieux – BactAlert 3D[®], no qual foram analisadas.

A coleta de secreção traqueal foi realizada em pacientes intubados, por aspiração, e realizamos a cultura quantitativa.

3.5. Cultivo, identificação fenotípica e teste de suscetibilidade dos isolados

3.5.1. Isolamento e identificação

Os *swabs* de vigilância, nos quais investigamos ativamente a colonização por VRE, foram semeados diretamente em Agar Enterococose® (Difco-BBL), através de estrias por esgotamento, sendo este, um Ágar Bile Esculina com Azida, que permite uma detecção e identificação rápida e seletiva do gênero *Enterococcus* spp²¹.

Após a detecção da positividade da hemocultura no sistema automatizado Biomerieux – BactAlert 3D®, foram confeccionadas as lâminas e realizada a coloração pelo método de GRAM. Para os microorganismos com características morfotintoriais GRAM positivas, o cultivo seguiu a semeadura em ágar sangue e ágar chocolate, este último, incubado em atmosfera de anaerobiose.

As uroculturas foram semeadas em ágar CLED (do inglês, *cystine-lactose-electrolyte-deficient*) inoculando a amostra de urina em toda a superfície do meio utilizando alça descartável estéril calibrada a 0,001mL segundo Clarrigde *et al*²², e ainda, semeadas em ágar Levine EMB (do inglês, *eosin methylene blue*) através de estrias por esgotamento, o que permitiu o isolamento das colônias²¹.

Os aspirados de secreção traqueal foram fluidificados com solução salina a 0,9% estéril e semeados em ágar sangue para análise quantitativa e em ágar manitol por esgotamento para o isolamento de colônias de microorganismos GRAM positivos.

A validação dos meios de semeadura e identificação foram realizadas através de cepas ATCC de *E. faecalis* (29.212) e *Escherichia coli* (24.922)²¹.

Após 24 horas de incubação a 37°C, as culturas clínicas foram triadas e analisadas as características morfológicas das colônias de microorganismos que apresentaram crescimento, seguido de confecção de esfregaço e a confirmação das características dos morfotintoriais dos microorganismos segundo GRAM.

Para o ágar CLED que apresentaram pequenas colônias amarelas com aproximadamente 0,5 mm de diâmetro, opacas e transparentes²¹ e no caso do ágar Sangue, que apresentaram pequenas colônias opacas, transparentes a acinzentadas, com presença de alfa ou beta hemólise, foram submetidas à prova da catalase⁸, que quando apresentou-se

negativa, induziu-nos a isolar tais colônias em Agar Enterococose® (Difco-BBL), o qual permitiu selecionarmos o gênero *Enterococcus* spp²¹.

Quanto aos *swabs* retais de vigilância, os mesmos foram semeados diretamente em Agar Enterococose® (Difco-BBL), sendo que a partir deste ponto, a identificação fenotípica seguiu a mesma metodologia, tanto para as culturas clínicas quanto para os *swabs* de vigilância epidemiológica.

Para as colônias que se desenvolveram na cultura em Agar Enterococose® (Difco-BBL), apresentando colônias pequenas, translúcidas com áreas marrom escuro a negras²³, utilizou-se o Kit para identificação de *Enterococcus* spp® (Probac do Brasil), o qual permitiu identificar as espécies importantes de *Enterococcus* spp para a clínica médica com base nas características bioquímicas do microrganismo (manitol, motilidade, arabinose, sorbitol). Foi inoculada a série de tubos referente aos testes de manitol, motilidade, arabinose e sorbitol, por picada central, e os tubos de arginina e controle da descarboxilação: inoculando com alça ou agulha, depositando o inóculo na parede do tubo, abaixo do óleo mineral. A série foi incubada a 35°C ($\pm$ 2°C). A interpretação do resultado gerou um valor numérico e foram aplicados à **Tabela 2**, a qual indicou a espécie do *Enterococcus* spp isolado.

Tabela 2. Tabela de identificação dos isolados, por espécie, a qual é parte integrante do kit para identificação de *Enterococcus* spp® da Probac do Brasil.

Número encontrado	Espécie	Grupo*
376	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Grupo I
375	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Grupo II
371	<i>Enterococcus mundtii</i>	Grupo II
370	<i>Enterococcus faecium</i>	Grupo II
340	<i>Enterococcus faecalis</i>	Grupo II
336	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Grupo II
335	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Grupo II
331	<i>Enterococcus mundtii</i>	Grupo II
330	<i>Enterococcus faecium</i>	Grupo II
300	<i>Lactococcus</i> spp	Grupo II

Fonte: Online[<http://www.probac.com.br/bula>]

3.5.2. Teste de suscetibilidade

Para o preparo dos inóculos, foram utilizadas culturas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da

escala 0.5 de Macfarland. Uma vez ajustada à densidade do inóculo, a semeadura foi feita através de *swab* estéril na superfície de Agar Mueller Hinton.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram obtidos através de testes de disco difusão (*Método de Kirby-Bauer*) a partir de discos impregnados com vancomicina apenas como triagem e os isolados que apresentaram resistência foram confirmados através da técnica de Etest® - Biomerieux para vancomicina, a qual consiste de um gradiente predefinido de concentrações de antibiótico em uma tira de plástico, a qual é utilizada para determinar a CIM (concentração inibitória mínima). Os isolados foram testados quanto à suscetibilidade à teicoplanina por disco difusão apenas visando a determinação da classificação do fenótipo de resistência do isolado.

As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação com base nos “breakpoints” estabelecidos pelo CLSI (do inglês, *Clinical Laboratory Standards Institute*) 2012.

Após todos os testes, as amostras foram inoculadas em caldo TSB com 20% de glicerol, as quais, após incubação por 24 horas a 37°C foram conservadas congeladas a -20°C.

Os isolados foram encaminhados ao Laboratório Especial de Microbiologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) para a realização de tipagem molecular.

3.6. Tipagem molecular por “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE)

Procedemos com a tipagem molecular dos isolados de VRE a partir das metodologias descritas por Bedendo & Pignatari²³, Zanella *et al*¹² e D’Azevedo *et al*²⁰ preparando os moldes de DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês, deoxyribonucleic acid) bacteriano a serem analisados, a partir dos isolados das culturas.

As amostras foram recuperadas através do descongelamento do estoque e semeando os isolados novamente em ágar sangue. Após 24 horas de incubação a 37°C, foram isoladas em caldo BHI (do inglês, *brain heart infusion*) para crescimento durante 24 horas e posteriormente centrifugação para obtenção de um “pellet” de células bacterianas.

Em um tubo de ensaio contendo o “pellet” de células bacterianas, obtido por

centrifugação da cultura de aproximadamente 1×10^8 células crescidas em 10 ml de caldo de soja tripticaseína, foi adicionado 1 ml de solução salina 0,9%. A seguir, após homogeneização, este conteúdo foi transferido para um tubo tipo eppendorf, previamente pesado, centrifugado, procedendo-se a seguir o cálculo para determinar a quantidade de células em miligramas. À massa do “pellet” foi adicionado volume igual, em μl , de 50mM de solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético, do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*) pH 8,0, sendo esta mistura agitada em vortex. Quinze microlitros desta mistura, adicionada de 200 μl de tampão TEM (tris-HCl 0,1M; pH8,0; EDTA 0,1M; Cloreto de sódio 0,15M) foi homogeneizada em agarose low melting à 1% e a seguir dispensada em moldes do tipo Bio-rad® (figura 2). Após secagem, os blocos de gel ou “plugs”, foram tratados com solução tampão de EC (Tris 6 mM, NaCl 1M, EDTA 0,1M, Brij 58 0,5%, Deoxycholate 0,2%, Sarkosyl 10,5%, pH 7,5), de CHEF TE (Tris 0,1M pH 7,5, EDTA 0,1M), de ES (EDTA 0,4M pH9,3 e Sarkosyl 1%) e de Proteinase K.

Para a restrição do DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*, Life Science, Canadá). A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40 segundos por 21 horas; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado *Lambda Ladder PFG Marker* (New England BioLabs) como marcador molecular. O gel foi corado com brometo de etídio por uma hora e fotografado sob transluminação UV.^{12,20,23}

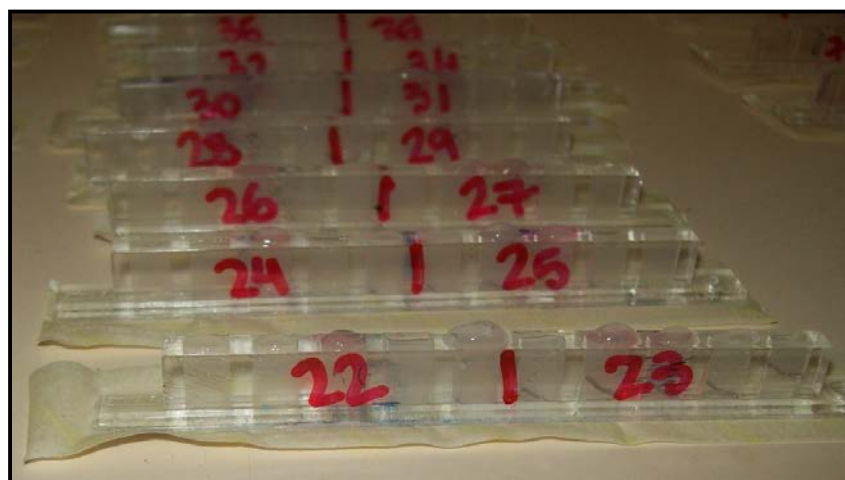


Figura 2. PFGE: confecção de “plugs” contendo as células de *Enterococcus* spp em agarose *low melting* à 1% realizada no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC-UNIFESP).

A análise de similaridade foi realizada utilizando o *software BioNumerics* (versão 7.1; *Applied Maths*, Bélgica). A criação do dendograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustadas para 1,5 e 0,5%, respectivamente²⁷. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos *clusters*.

3.7. Estudo dos fatores de risco e prognóstico

Fatores de risco foram avaliados em estudo de caso-controle, em que pacientes com culturas positivas foram classificados como “casos”. O grupo controle foi composto por indivíduos admitidos no mesmo hospital na mesma data que os casos, pareados na proporção de 2:1 (dois controles para cada caso).

As análises foram feitas em conjunto e isoladamente para os grupos A, B, e C (descritos no item 3.6). Foram seguidas as recomendações feitas por Harris *et al*²⁴: grupo controle selecionado da população sob risco, ajuste para doença de base/gravidade e ajuste para tempo sob risco.

Foram colhidos em prontuários dados demográficos, tempo de internação (quando aplicável), comorbidades, procedimentos, uso de dispositivos e uso de antimicrobianos. A variável “Tempo sob risco” foi definida como: (a) Número de dias entre admissão no hospital e primeira cultura positiva, para os casos; (b) Número de dias entre admissão no hospital e a saída (alta, transferência ou óbito), para os controles. As comorbidades foram codificadas conforme as categorias da Classificação Internacional de Doenças, 10ª revisão (CID10). A gravidade foi estimada pelo *score* de Charlson.²⁵

A análise de prognóstico foi feita com a mesma base de sujeitos (casos e controles), tendo “óbito” como desfecho e “colonização/infecção por VRE” como um dos possíveis fatores de risco. Os resultados foram ajustados para a gravidade das doenças de base.

Análises estatísticas envolveram modelos uni e multivariados. Os primeiros foram realizados através dos testes do Chi-quadrado e Exato de Fisher (para variáveis dicotômicas) e T de Student ou Mann-Whitney (para variáveis contínuas). Modelos multivariados de regressão logística binária foram aplicados para identificação de fatores de risco independentes²⁶. Resumidamente, foi realizado um primeiro modelo multivariado incluindo

todas as variáveis que atingiram $p < 0.1$ na análise univariada. Um segundo modelo utilizou somente aquelas que foram significantes na etapa anterior. A partir disso, diversos modelos foram construídos, adicionando (uma por vez) as todas as variáveis do estudo. Foram mantidas na etapa final aquelas que modificaram o Odds Ratio de alguma variável significativa em mais de 10%. Em todas as análises foi considerado um limite de significância de 5% ($p < 0,05$). Para expressão gráfica de resultados numéricos foram utilizados boxplots. Todas as análises foram conduzidas no *software* SPSS 19.0 (©IBM, Armonk, NY, USA).

3.8. Questões éticas

- ✓ A pesquisa atendeu as normas da Resolução 196/96, a qual foi apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima / C.E.P. número 017/2011 e protocolo E-023/11 (Anexo 01).
- ✓ *Autonomia e confidencialidade*: por tratar-se de estudo retrospectivo, a autonomia e confidencialidade do estudo foi documentada através da assinatura de Termo de responsabilidade dos pesquisadores junto ao Comitê de Ética em Pesquisa supracitado.

Resultados

4. RESULTADOS

Dentre os 130 pacientes incluídos como “casos”, 88 (67,7%) apresentaram cultura positiva para VRE no HEB, dos quais 77 (87,5%) foram considerados casos autóctones e 11 (12,5%), como casos importados por apresentarem a primeira cultura positiva nas primeiras 48 horas de internação. Ao verificarmos as origens dos casos importados pelo HEB, detectamos que 3 (27,3%) foram oriundos do HEMA e 8 (72,7%) eram pacientes do grupo EXTERNOS. Quanto aos 42 (32,3%) pacientes que exibiram positividade nas culturas para VRE durante a internação no HEMA, apenas 1 (2,4%) foi caracterizado como caso importado e este, do HEB; consequentemente os outros 41 (97,6%) casos foram autóctones. A **figura 3** mostra o esquema de como foram distribuídos os casos entre “importados” e “autóctones”.

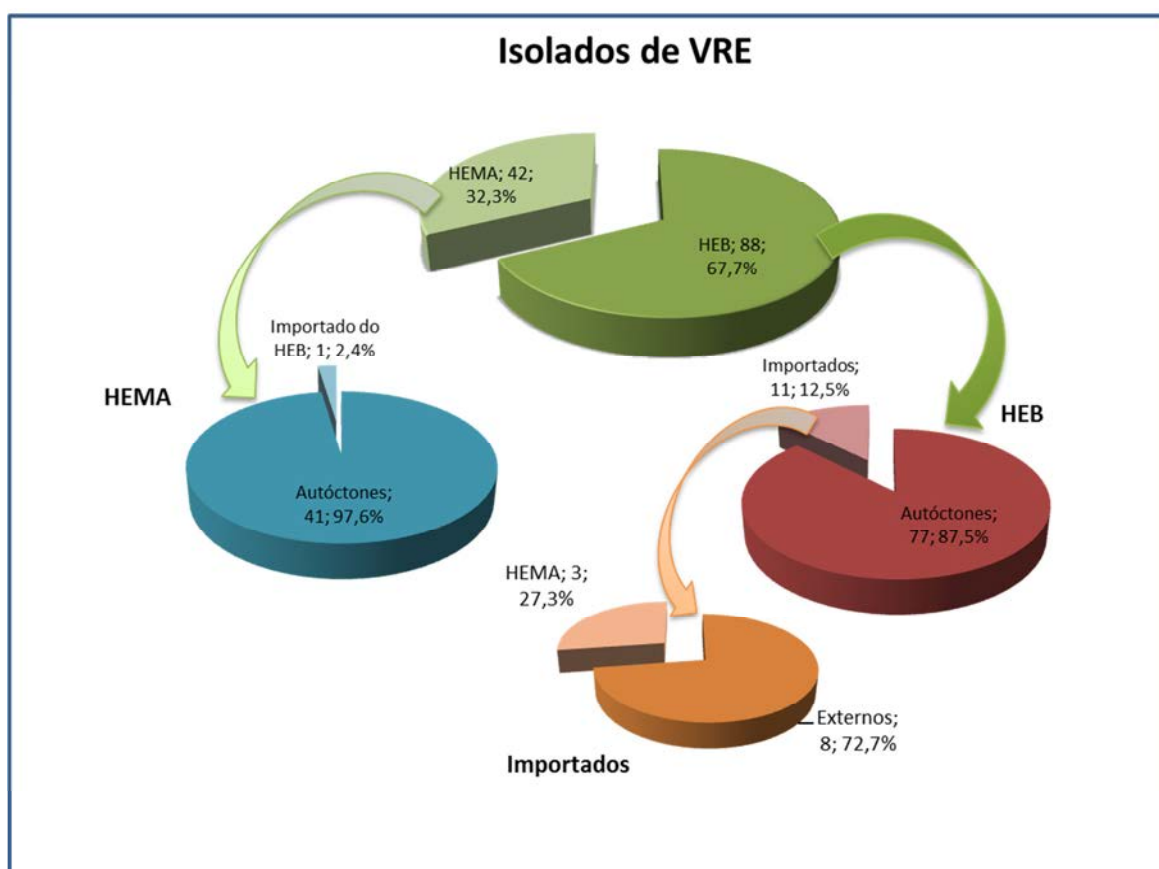


Figura 3. Esquema de distribuição dos casos de VRE como “importados” e “autóctones”

Após tais atribuições, os grupos de pacientes que apresentaram cultura positiva para VRE ficaram assim designados: 78 (60,0%) pacientes do grupo HEB, 44 (33,8%) pacientes do grupo HEMA e 8 (6,2%) pacientes do grupo EXTERNOS, conforme já relatado na casuística.

4.1. Análise microbiológica

Em 16 de Janeiro de 2010, identificamos o primeiro VRE do HEB em urina de paciente internado na UTI de adultos. Até então, levantamentos aleatórios de vigilância não haviam detectado esse agente. A partir desse momento, foram instituídos novos critérios de culturas de vigilância para ambas instituições (HEB e HEMA). Tais critérios permitiram a realização deste estudo retrospectivo, o qual observou que 117 (90,0%) amostras utilizadas para a realização das culturas microbiológicas foram swabs retais da rotina de vigilância do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) e 13(10,0%) de amostras clínicas, das quais, 10 (7,7%) foram amostras de urina, 2 (1,5%) de sangue e 1 (0,8%) amostra de secreção traqueal.

Quanto aos isolados de VRE, 113 (86,9%) foram da espécie *Enterococcus faecium* e 17 (13,1%) foram *Enterococcus faecalis*, distribuídos em ambas as instituições.

Detectamos altos níveis de resistência dos isolados à vancomicina, confirmados através dos resultados do E-test que exibiram índices de concentração inibitória mínima (CIM) maiores que 256 µg/ml e ausência de halo de inibição na técnica de disco difusão à teicoplanina. Os altos níveis de resistência à vancomicina e à teicoplanina, sugerem a presença do fenótipo de resistência *VanA* nos isolados recuperados das culturas dos pacientes incluídos neste estudo.

4.2. Incidência de VRE e vigilância hospitalar

Considerando as informações relevantes quanto ao controle das infecções hospitalares e ao monitoramento de prováveis surtos hospitalares por VRE, a **figura 4** exibe o número de isolados por unidade hospitalar.

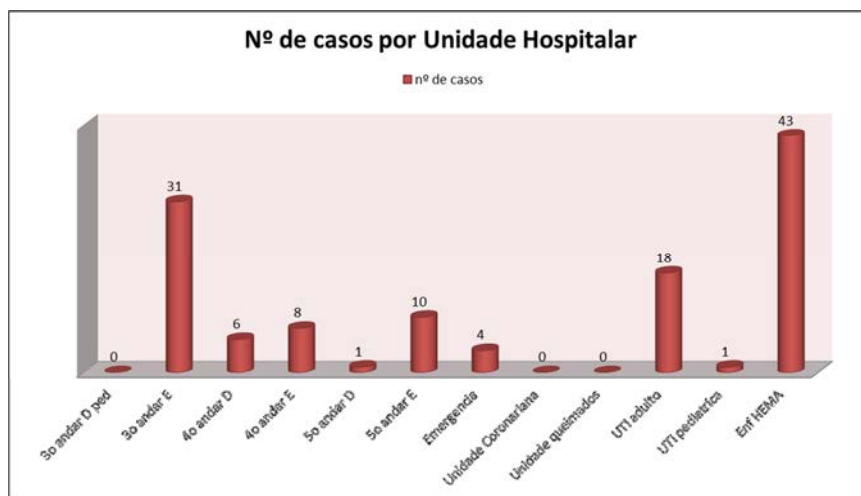


Figura 4. Número pacientes com VRE, considerando infecção clínica ou colonização, por unidade hospitalar, desde janeiro de 2010 a junho de 2012.

As taxas de isolados por 10.000 pacientes dia no HEB, demonstraram, através do traçado exibido na **figura 5.a** e considerando os valores de LAS (limite de alerta superior) e de LCS (limite de controle superior), que não tivemos a ocorrência de surto hospitalar durante os levantamentos deste estudo, apenas podemos ressaltar que em setembro de 2010 e em junho de 2012, último mês incluído em nosso estudo, nossos achados detectaram duas situações de alerta quanto à colonização por VRE. O perfil traçado na **figura 5.b**, as taxas de isolados por 10.000 pacientes dia no HEMA, mostraram a existência de um breve surto ocorrido em novembro de 2010, no entanto, nos demais meses do estudo, as taxas de colonização ou infecção mantiveram-se baixas.

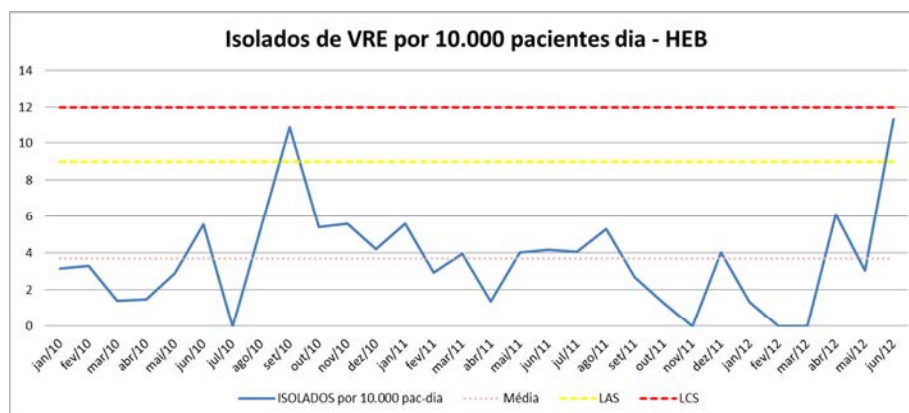


Figura 5.a. Diagrama de controle de isolados por 10.000 pacientes-dia do HEB. LAS: Limite de Alerta Superior; LCS: Limite de Controle Superior; Dados de pacientes-dia fornecidos pelo SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatística) do HEB.

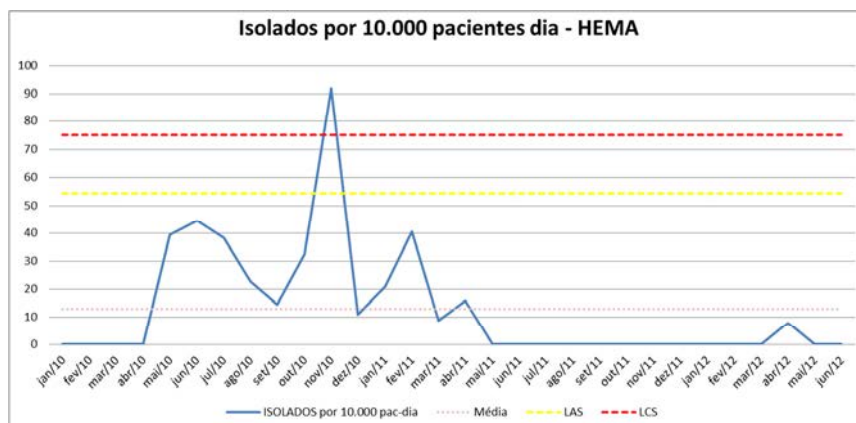
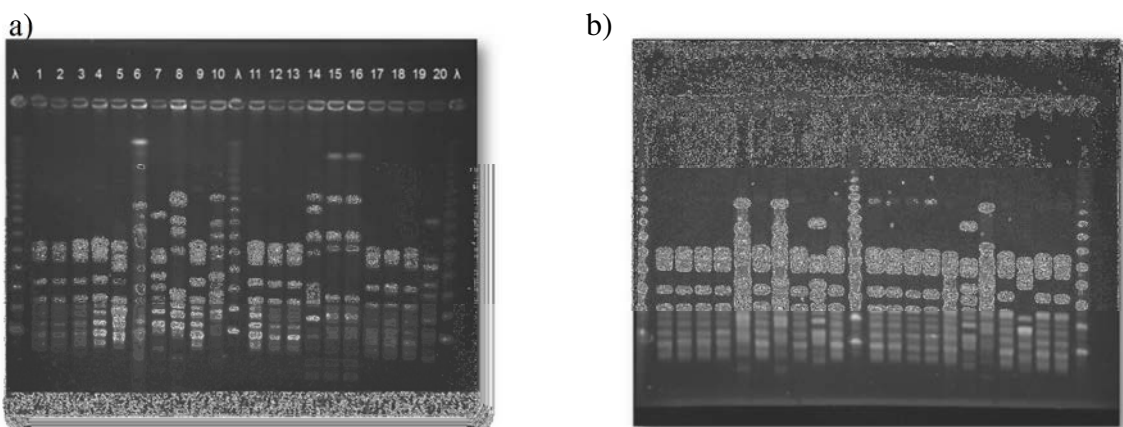


Figura 5.b. Diagrama de controle de isolados por 10.000 pacientes-dia do HEMA. LAS: Limite de Alerta Superior; LCS: Limite de Controle Superior; Dados de pacientes-dia fornecidos pelo SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatística) do HEMA.

4.3. Análise molecular

Após análise molecular dos isolados, de acordo com a técnica proposta no item 3.5 desta dissertação, as fotografias dos géis, obtidas sob transluminação UV, já apresentaram a evidência visual da existência de um “cluster” dominante (figuras 6, a e b), desde o primeiro caso isolado da urina do paciente da UTI de adultos (amostra nº 01). Tal observação foi confirmada através das análises de similaridade pelo software *BioNumerics* (versão 7.1; Applied Maths, Bélgica), conforme as evidências que ainda serão exibidas nos resultados deste estudo.



Figuras 6.a e b. Tipagem molecular de VRE por técnica de PFGE; a imagem foi obtida após coloração do gel com Brometo de etídio e fotografia com transluminação UV realizada no Laboratório ALERTA da EPM-UNIFESP em 22 de agosto de 2012.

A afirmação supracitada foi então confirmada através da criação do dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), conforme descrito anteriormente na metodologia, pois um dos achados interessantes deste estudo foi notar que, partindo de um coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$, a determinação dos “clusters” demonstrou, não somente a circulação de clones entre as diferentes unidades hospitalares do HEB, como também, entre HEB e HEMA. Revelou ainda, a existência de um “cluster” maior, arbitrariamente denominado de Tipo *Afm* (*E. faecium* do tipo A da tipagem PFGE).

Apresentamos a seguir os dendrogramas das espécies *E. faecalis* (figura 7) e *E. faecium* (figura 8) resistentes à vancomicina.

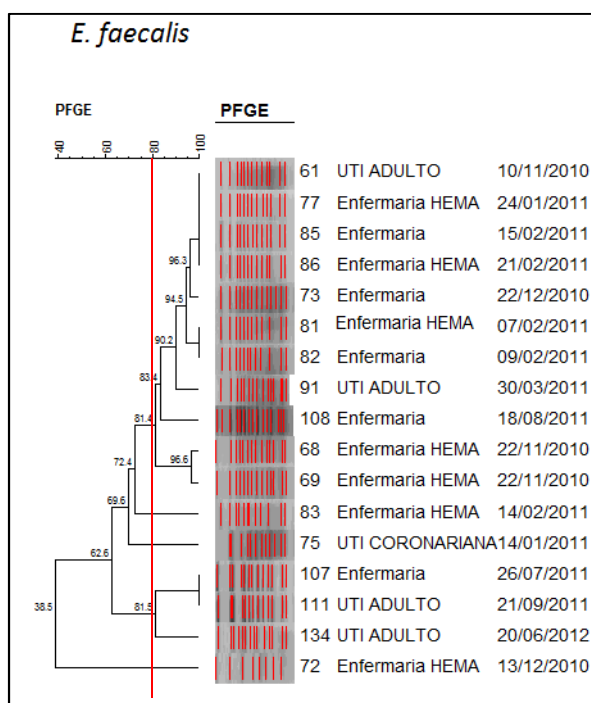
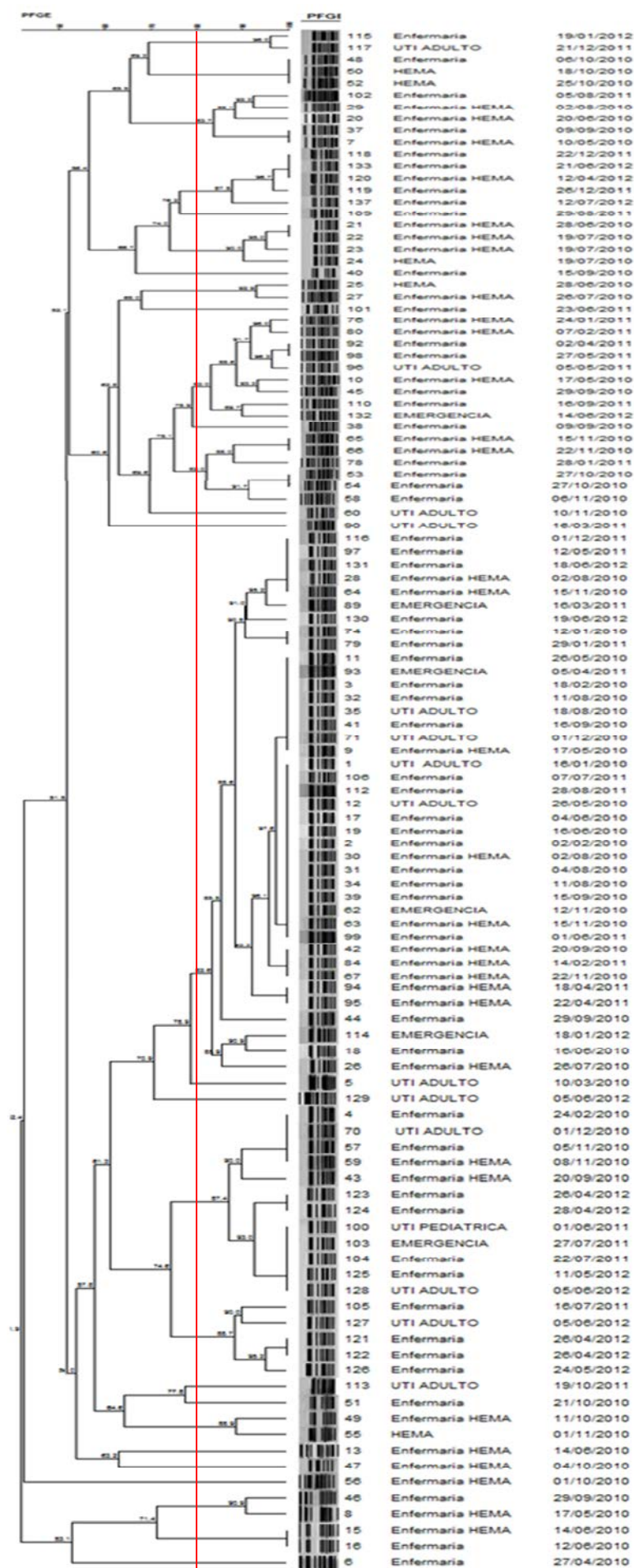


Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics Applied Maths) de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina, isolados de pacientes dos dois hospitais de estudos; as culturas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do HEB/FAMESP; o traço vermelho indica o limite do coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$.

Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics Applied Maths) de *E. faecium* resistentes a vancomicina, isolados de janeiro de 2010 a junho de 2012 de pacientes dos dois hospitais de estudo; as culturas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do HEB/FAMESP; o traço vermelho indica o limite do coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$.



Estabelecemos como padrão para classificação das cepas como formadoras ou não de “clusters”, aquelas que apresentaram, no mínimo, 5 isolados com semelhança estabelecida pelo coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ na análise do dendograma. Considerando esses critérios, e ainda, nomeando as cepas tipadas por PFGE de *Afm* a *Z3fm* para *E.faecium* e de *Afc* a *Efc* para *E.faecalis*, as mesmas foram classificadas conforme descrito a seguir: os tipos de *Afm* a *Gfm* e *Afc*, foram representados por isolados formadores de “clusters”, totalizando 93 (71,3%) isolados, sendo que somente o tipo *Afm* foi formado por 40 (30,8%) dos 130 isolados recuperados de pacientes incluídos como “casos” neste estudo. A **tabela 2**, exibe com maiores detalhes a distribuição dos clones de VRE tipados por metodologia molecular.

Tabela 2. Distribuição dos clones de VRE, tipados por PFGE, entre os grupos HEB, HEMA e EXTERNOS.

		Grupos							
PFGE		HEB (n=78)		HEMA (n=44)		EXTERNOS (n=8)		Total (n=130)	
<i>E. faecium</i>									
	<i>Afm</i>	24	30,8%	12	27,3%	4	50,0%	40	30,8%
	<i>Bfm</i>	10	12,8%	2	4,5%	0	0,0%	12	9,2%
	<i>Cfm</i>	5	6,4%	3	6,8%	1	12,5%	9	6,9%
	<i>Dfm</i>	6	7,7%	0	0,0%	0	0,0%	6	4,6%
	<i>Efm</i>	2	2,6%	3	6,8%	0	0,0%	5	3,8%
	<i>Ffm</i>	4	5,1%	1	2,3%	0	0,0%	5	3,8%
	<i>Gfm</i>	4	5,1%	0	0,0%	1	12,5%	5	3,8%
	<i>Hfm</i>	0	0,0%	4	9,1%	0	0,0%	4	3,1%
	<i>Ifm</i>	1	1,3%	2	4,5%	0	0,0%	3	2,3%
	<i>Jfm</i>	2	2,6%	0	0,0%	0	0,0%	2	1,5%
	<i>Kfm</i>	0	0,0%	2	4,5%	0	0,0%	2	1,5%
	<i>Lfm</i>	0	0,0%	2	4,5%	0	0,0%	2	1,5%
	<i>Mfm</i>	1	1,3%	1	2,3%	0	0,0%	2	1,5%
	<i>Nfm</i>	1	1,3%	1	2,3%	0	0,0%	2	1,5%
	<i>Ofm</i>	0	0,0%	0	0,0%	1	12,5%	1	0,8%
	<i>Pfm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Qfm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Rfm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Sfm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Tfm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Ufm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Vfm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Wfm</i>	0	0,0%	1	2,3%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Xfm</i>	0	0,0%	1	2,3%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Yfm</i>	0	0,0%	1	2,3%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Z1fm</i>	0	0,0%	1	2,3%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Z2fm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Z3fm</i>	1	1,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8%
Total <i>E. faecium</i>		69	88,5%	37	84,1%	7	87,5%	113	86,9%
<i>E. faecalis</i>									
	<i>Afc</i>	6	7,7%	5	11,4%	0	0,0%	11	8,5%
	<i>Bfc</i>	3	3,8%	0	0,0%	0	0,0%	3	2,3%
	<i>Cfc</i>	0	0,0%	1	2,3%	0	0,0%	1	0,8%
	<i>Dfc</i>	0	0,0%	0	0,0%	1	12,5%	1	0,8%
	<i>Efc</i>	0	0,0%	1	2,3%	0	0,0%	1	0,8%
Total <i>E. faecalis</i>		9	11,5%	7	15,9%	1	12,5%	17	13,1%

* Em vermelho: isolados formadores de "clusters"

4.4. Estudo dos fatores de risco

Iniciamos esta etapa do estudo, após realizarmos o levantamento dos dados de prontuário, tanto para os “casos” quanto para os “controles”, como por exemplo, os dados demográficos, dados de internação, as comorbidades, procedimentos, uso de dispositivos e terapêutica antimicrobiana, conforme a ficha de levantamento de dados, exemplificada no anexo 3, páginas 1 e 2.

Primeiramente realizamos uma análise univariada comparando a distribuição dos possíveis fatores de risco entre os “casos”, em ambas instituições, HEB e HEMA.

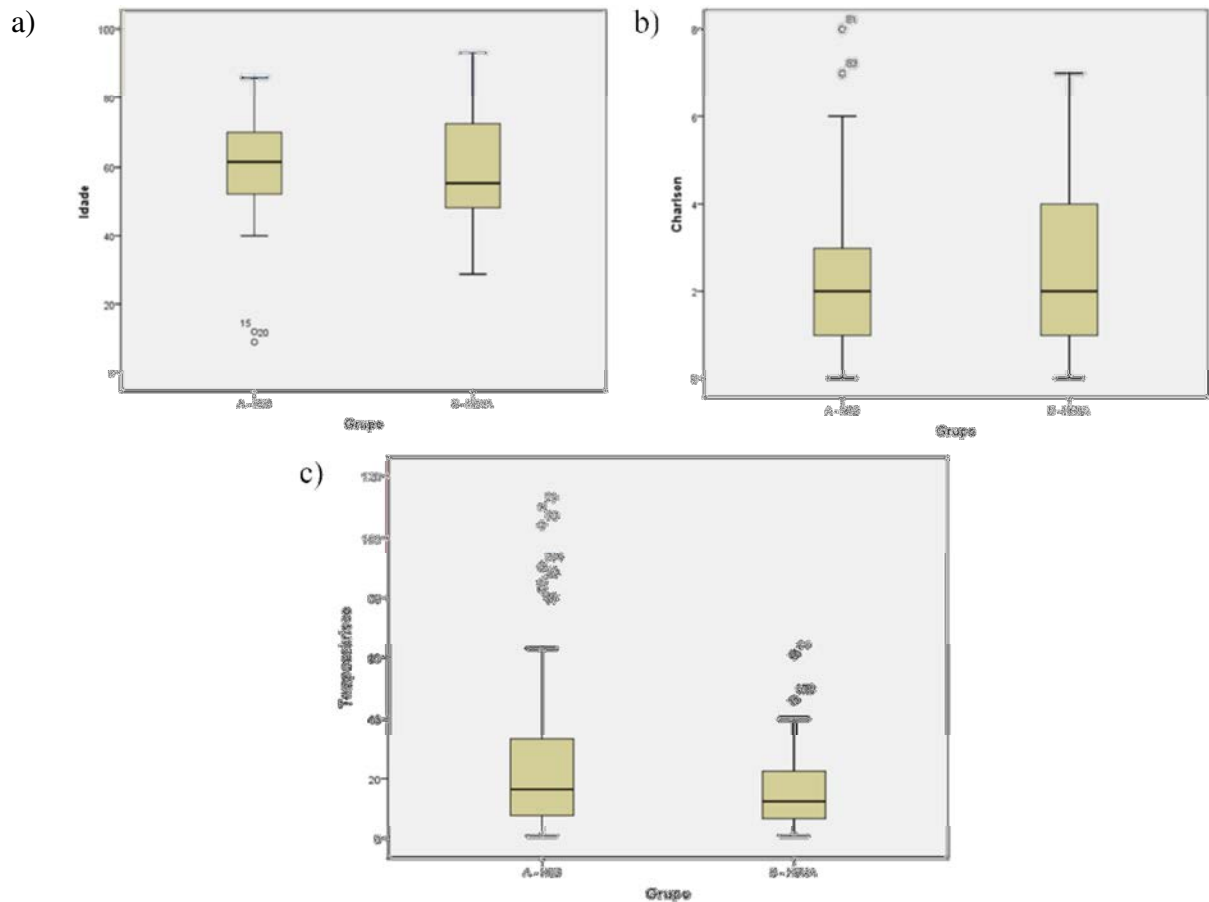
Os resultados das análises comparativas de fatores representados por variáveis numéricas como idade, coeficiente de Chalsom e tempo sob risco, foram dados através da mediana e interquartis (valores dos quartis 25% e 75% da distribuição das variáveis), os quais não demonstraram diferenças significantes conforme pode ser verificado nas **figuras 9. a, b e c**, ou ainda, na **tabela 3**.

A construção dos resultados das análises univariadas e multivariadas para a determinação dos fatores de risco para infecção e/ou colonização por VRE seguiu várias etapas. Tais etapas envolveram a análise geral do estudo de caso-controle, a seguir obtivemos resultados individualizados para cada instituição (HEB e HEMA), e ainda, entre os casos, os fatores para aquisição de cepas formadoras de “clusters” e de cepas do Tipo A da tipagem de PFGE, as quais formaram o “cluster” mais expressivo encontrado em nosso estudo.

Uma análise descritiva da variação na frequência de potenciais fatores de risco entre as duas instituições deste estudo, demonstrou que as diferenças mais significantes estão relacionadas à AIDS como comorbidade ($p<0,001$), ao uso de esteróides ($p<0,001$), procedimentos cirúrgicos ($p<0,001$), debridamentos ($p=0,001$), uso de ventilação mecânica ($p=0,001$) e antibioticoterapia com cefazolina ($p=0,001$). O resultado completo desta análise está detalhado na **tabela 4**.

Os resultados da análise univariada com todos os pacientes incluídos no estudo de caso-controle apontou muitos fatores significantes, no entanto, a análise multivariada confirmou como fatores de risco para infecção ou colonização por VRE, o uso de ventilação mecânica ($p=0,007$; OR=8,12; IC95% 1,76-37,54) e a terapêutica antimicrobiana com piperacilina-tazobactam ($p=0,002$; OR=3,62; IC95% 1,62-8,40), cefepime ($p=0,002$;

OR=2,96; IC95% 1,51-5,82) e imipenem ($p=0,003$; OR=3,81; IC95% 1,57-9,24). O uso de cateter venoso central, interessantemente apresentou efeito protetor ($p=0,008$; OR=0,11; IC95% 0,02-0,57). O resultado completo das análises estão expressos através da **tabela 5**.



Figuras 9.a, b e c . Boxplot com comparação de mediana e variação (IQ) da idade (a), do índice de comorbidades de *Charlson* (marcador de gravidade) (b) e tempo sob risco (c) entre os grupos HEB e HEMA.

Ao analisarmos separadamente o HEB, os resultados da análise univariada novamente exibiram muitos fatores de risco significantes e a análise multivariada apontou como fatores de risco para infecção ou colonização por VRE no HEB, o uso de esteroides ($p=0,03$; OR=2,41; IC95% 1,11-5,23), de ventilação mecânica ($p=0,03$; OR=6,03; IC95% 1,23-29,47) e a terapêutica antimicrobiana com cefepime ($p=0,03$; OR=2,77; IC95% 1,12-6,84) e imipenem ($p=0,03$; OR=2,41; IC95% 1,11-5,23). O uso de cateter venoso central, ainda apresentou efeito protetor ($p=0,01$; OR=0,12; IC95% 0,02-0,64). A **tabela 6** mostra o resultado completo das análises dos fatores de risco para o HEB.

Tabela 4. Análise descritiva das diferenças dos pacientes colonizados/infectados por VRE entre HEB e o HEMA.

Fatores de risco	HEB (n = 78)	HEMA (n = 44)	p
<i>Dados demográficos</i>			
Idade (mediana)	61,5 (52 - 70)	55,5 (48 - 72,3)	0,3
<i>Comorbidades</i>			
Doença cardíaca	15 (19,2)	6 (13,6)	0,43
Doença pulmonar	19 (24,4)	20 (45,5)	0,02
Doença renal	17 (21,8)	1 (2,3)	0,004
Doença hepática	8 (10,3)	3 (6,8)	0,74
Doença do SNC	12 (15,4)	17 (38,6)	0,004
Diabetes mellitus	23 (29,5)	11 (25,0)	0,6
Linfomas/Leucemias	3 (3,8)	0	0,55
Neoplasias sólidas	7 (9,0)	0	0,048
AIDS	0	7 (15,9)	<0,001
Escore de Charlson (mediana)	2 (1 - 3)	2 (1 - 4)	0,5
<i>Dados de internação</i>			
Tempo sob risco (mediada)	16,5 (8 - 33)	12,5 (6 - 22,5)	0,1
Transferência imediata	7 (9,0)	4 (9,1)	1,00
<i>Imunidade</i>			
Neutropenia	7 (9,0)	1 (2,3)	0,26
Uso de esteróide	38 (50,0)	7 (15,9)	<0,001
<i>Procedimentos e dispositivos</i>			
Cirurgia	44 (56,4)	10 (22,7)	<0,001
Gastro-cirurgia	9 (11,5)	0	0,03
Amputação	12 (9,8)	4 (9,1)	0,32
Debridamentos	17 (21,8)	0	0,001
Traqueostomia	9 (11,5)	6 (14,0)	0,7
Traqueostomia	9 (11,5)	6 (14,0)	0,7
Ventilação mecânica	31 (39,7)	5 (11,6)	0,001
Cateter Venoso Central	24 (30,8)	5 (11,6)	0,02
Sonda Vesical de Demora	44 (56,4)	12 (27,3)	0,002
Nutrição parenteral	7 (9,0)	0	0,048
Uso de drenos	4 (5,1)	1 (2,3)	0,65
<i>Uso de antimicrobianos</i>			
Ampicilina	1 (1,3)	0	1,00
Ampicilina-Sulbactam	3 (3,8)	1 (2,3)	1,00
Amoxicilina-clavulanato	15 (19,2)	8 (18,2)	0,89
Oxacilina	2 (2,6)	5 (11,6)	0,1
Piperacilina-Tazobactam	24 (30,8)	10 (22,7)	0,34
Cefalotina	6 (7,7)	1 (2,3)	0,42
Cefazolina	21 (26,9)	1 (2,3)	0,001
Ceftriaxona	1 (1,3)	2 (4,5)	0,3
Ceftazidima	0	1 (2,3)	0,36
Ceepime	34 (43,6)	12 (27,3)	0,07
Imipenem	25 (32,1)	10 (22,7)	0,27
Meropenem	13 (16,7)	4 (9,1)	0,25
Ertapenem	1 (1,3)	2 (4,5)	0,3
Vancomicina	35 (44,9)	14 (31,8)	0,16
Linezolida	0	1 (2,3)	0,36
Ciprofloxacino	28 (35,9)	14 (31,8)	0,65
Levofloxacino	6 (7,7)	5 (11,6)	0,52
Clindamicina	19 (24,4)	7 (15,9)	0,27
Metronidazol	10 (12,8)	1 (2,3)	0,1
Sulfametoxazol-trimetoprim	2 (2,6)	4 (9,1)	0,19
Polimixina B	1 (1,3)	0	1,00
Antifungicos	9 (11,5)	2 (4,5)	0,32
<i>Isolados</i>			
<i>E. faecalis</i>	9 (11,5)	7 (15,9)	0,49
Formadores de "cluster"	61 (78,2)	26 (59,1)	0,03
PFGE tipo <i>Afm</i>	24 (30,8)	12 (27,3)	0,68

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson e tempo sob risco.

Tabela 5. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por VRE para os pacientes de ambos hospitais de estudo.

Fatores de risco	Análise univariada			Análise Multivariada	
	Casos (n = 122)	Controles (n = 244)	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%) p
<i>Dados demográficos</i>					
Sexo masculino	78 (63,9)	123 (50,4)	1,74 (1,12 - 2,73)	0,01	
Idade (mediana, quartis)	61 (50 - 71)	58 (44 - 73)		0,21	
<i>Comorbidades</i>					
Doença cardíaca	21 (17,2)	33 (13,6)	1,32 (0,73 - 2,39)	0,37	
Doença pulmonar	39 (32,0)	66 (27,3)	1,25 (0,78 - 2,01)	0,35	
Doença renal	18 (14,8)	31 (12,8)	1,18 (0,63 - 2,21)	0,6	
Doença hepática	11 (9,0)	8 (3,3)	2,91 (1,14 - 7,44)	0,02	
Doença do SNC	29 (23,8)	35 (14,3)	1,86 (1,08 - 3,23)	0,02	
Diabetes mellitus	34 (27,9)	46 (18,9)	1,66 (0,99 - 2,75)	0,05	
Linfomas/Leucemias	3 (2,5)	2 (0,8)	3,05 (0,50 - 18,50)	0,33	
Neoplasias sólidas	7 (5,7)	19 (7,8)	0,72 (0,29 - 1,77)	0,47	
AIDS	7 (5,7)	24 (9,8)	0,56 (0,23 - 1,33)	0,18	
Trauma		16 (6,6)		0,004	
Índice de Comorbidade de Charlson	2 (1 - 4)	1 (1 - 3)		0,004	
<i>Dados de internação</i>					
Tempo sob risco (mediana, quartis)	15 (7,75 - 30,0)	9 (5 - 16)		<0,001	
Transferência imediata	11 (9,0)	11 (4,5)	2,01 (0,88 - 4,99)	0,09	
<i>Imunidade</i>					
Neutropenia	8 (6,6)	11 (4,5)	1,48 (0,58 - 3,78)	0,41	
Uso de esteróide	45 (37,5)	57 (23,4)	1,98 (1,23 - 3,16)	0,005	
<i>Procedimentos e dispositivos</i>					
Cirurgia	54 (44,3)	89 (36,5)	1,38 (0,89 - 2,15)	0,18	
Gastro-cirurgia	9 (7,4)	22 (9,0)	0,80 (0,36 - 1,80)	0,6	
Amputação	16 (13,1)	8 (3,3)	4,45 (1,85 - 10,73)	<0,001	
Debridamentos	17 (13,9)	8 (3,3)	4,78 (2,00 - 11,41)	<0,001	
Traqueostomia	15 (12,4)	8 (3,3)	4,18 (1,72 - 10,15)	0,001	
Ventilação mecânica	36 (29,8)	25 (10,2)	3,71 (2,10 - 6,55)	<0,001	8,12 (1,76 - 37,54)
Cateter Venoso Central	29 (23,8)	35 (14,3)	1,86 (1,08 - 3,23)	0,03	0,11 (0,02 - 0,57)
Sonda Vesical de Demora	56 (45,9)	79 (32,4)	1,77 (1,14 - 2,77)	0,01	0,008
Nutrição parenteral	7 (5,7)	3 (1,2)	4,89 (1,24 - 19,26)	0,02	
Uso de drenos	5 (4,1)	1 (0,4)	10,38 (1,20 - 89,90)	0,02	
<i>Uso de antimicrobianos</i>					
Ampicilina	1 (0,8)	4 (1,6)	0,05 (0,06 - 4,49)	0,67	
Ampicilina-Sulbactam	4 (3,3)	3 (1,2)	2,72 (0,60 - 12,37)	0,23	
Amoxicilina-clavulanato	23 (18,9)	56 (23,0)	0,78 (0,45 - 1,34)	0,37	
Oxacilina	7 (5,8)	7 (2,9)	2,08 (0,71 - 6,07)	0,24	
Piperacilina-Tazobactam	34 (27,9)	18 (7,4)	4,85 (2,60 - 9,04)	<0,001	3,69 (1,62 - 8,40)
Cefalotina	7 (5,8)	7 (2,9)	2,05 (0,07 - 5,99)	0,24	
Cefazolina	22 (18,0)	31 (12,7)	1,51 (0,83 - 2,74)	0,17	
Ceftriaxona	3 (2,5)	4 (1,6)	1,51 (0,33 - 6,87)	0,69	
Ceftazidima	1 (0,8)			0,33	
Ceepime	46 (37,7)	33 (13,6)	3,85 (2,29 - 6,47)	<0,001	2,96 (1,51 - 5,82)
Imipenem	35 (28,7)	15 (6,1)	6,14 (3,20 - 11,80)	<0,001	3,81 (1,57 - 9,24)
Meropenem	17 (13,9)	4 (1,6)	9,71 (3,19 - 29,57)	<0,001	0,003
Ertapenem	3 (2,5)	2 (0,8)	3,05 (0,50 - 18,50)	0,33	
Vancomicina	49 (40,2)	25 (10,2)	5,88 (3,39 - 10,19)	<0,001	
Linezolida	1 (0,8)			0,33	
Ciprofloxacino	42 (34,4)	49 (20,1)	2,09 (1,28 - 3,40)	0,003	
Levofloxacino	11 (9,0)	23 (9,4)	0,95 (0,45 - 2,02)	0,9	
Clindamicina	26 (21,3)	20 (8,2)	3,03 (1,62 - 5,70)	<0,001	
Metronidazol	11 (9,0)	10 (4,1)	2,32 (0,96 - 5,62)	0,06	
Sulfametoxazol-trimetoprim	6 (4,9)	15 (6,1)	0,79 (0,30 - 2,09)	0,63	
Polimixina B	1 (0,8)			0,33	
Antifúngicos	11 (9,0)	13 (5,3)	1,76 (0,77 - 4,06)	0,18	

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson e tempo sob risco;
OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Tabela 6. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por VRE somente para os pacientes do HEB (Hospital Estadual Bauru)

Fatores de risco	Análise univariada				Análise Multivariada	
	Casos (n = 78)	Controles (n = 156)	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
<i>Dados demográficos</i>						
Sexo masculino	47 (60,3)	81 (51,3)	1,44 (0,83 - 2,50)	0,19		
Idade (mediana, quartis)	61,5 (51,75 - 70,25)	61,5 (47,75 - 74,0)		1,00		
<i>Comorbidades</i>						
Doença cardíaca	15 (19,2)	27 (17,1)	1,15 (0,57 - 2,32)	0,69		
Doença pulmonar	19 (24,4)	39 (24,8)	0,97 (0,52 - 1,83)	0,93		
Doença renal	17 (21,8)	26 (16,5)	1,42 (0,72 - 2,80)	0,31		
Doença hepática	8 (10,3)	7 (4,4)	2,47 (0,86 - 7,07)	0,08		
Doença do SNC	12 (15,4)	14 (8,9)	1,87 (0,82 - 4,26)	0,13		
Diabetes mellitus	23 (29,5)	28 (17,7)	1,94 (1,03 - 3,67)	0,03		
Linfomas/Leucemias	3 (3,8)	2 (1,3)	3,12 (0,51 - 19,00)	0,33		
Neoplasias sólidas	7 (9,0)	17 (10,8)	0,81 (0,32 - 2,06)	0,67		
AIDS		3 (1,9)		0,55		
Trauma		15 (9,5)		0,003		
Índice de comorbidade de Charlson	2 (1 - 3,25)	1 (1 - 2)		<0,001		
<i>Dados de internação</i>						
Internação anterior no HEMA	7 (9,0)			<0,001		
Tempo sob risco (mediada, quartis)	16,50 (8 - 33,25)	9 (5 - 17)		0,001		
Transferência imediata	7 (9,0)			<0,001		
<i>Imunidade</i>						
Neutropenia	7 (9,0)	10 (6,4)	1,45 (0,53 - 3,97)	0,47		
Uso de esteróide	38 (50,0)	41 (25,9)	2,85 (1,61 - 5,06)	<0,001	2,41 (1,11 - 5,23)	0,03
<i>Procedimentos e dispositivos</i>						
Cirurgia	44 (56,4)	74 (46,8)	1,47 (0,85 - 2,54)	0,17		
Gastro-cirurgia	9 (11,5)	20 (12,7)	0,90 (0,39 - 2,08)	0,81		
Amputação	12 (15,4)	6 (3,8)	4,61 (1,66 - 12,80)	0,002		
Debridamentos	17 (21,8)	8 (5,1)	5,23 (2,14 - 12,74)	<0,001		
Traqueostomia	9 (11,5)	8 (5,1)	2,45 (0,91 - 6,61)	0,07		
Ventilação mecânica	31 (39,7)	25 (15,8)	3,51 (1,88 - 6,54)	<0,001	6,03 (1,23 - 29,47)	0,03
Cateter Venoso Central	24 (30,8)	33 (20,9)	1,68 (0,91 - 3,11)	0,1	0,12 (0,02 - 0,64)	0,01
Sonda Vesical de Demora	44 (56,4)	54 (34,2)	2,49 (1,43 - 4,34)	0,001		
Nutrição parenteral	7 (9,0)	3 (1,9)	5,01 (1,28 - 20,28)	0,02		
Uso de drenos	4 (5,1)	1 (0,6)	8,48 (0,93 - 77,26)	0,04		
<i>Uso de antimicrobianos</i>						
Ampicilina	1 (1,3)	2 (1,3)	1,01 (0,09 - 11,35)	1,0		
Ampicilina-Sulbactam	3 (3,8)	3 (1,9)	2,07 (0,41 - 10,48)	0,4		
Amoxicilina-clavulanato	15 (19,2)	25 (15,8)	1,27 (0,63 - 2,57)	0,51		
Oxacilina	2 (2,6)	5 (3,2)	0,82 (0,16 - 4,30)	1,0		
Piperacilina-Tazobactam	24 (30,8)	15 (9,5)	4,24 (2,07 - 8,68)	<0,001		
Cefalotina	6 (7,7)	4 (2,5)	3,21 (0,88 - 11,72)	0,1		
Cefazolina	21 (26,9)	30 (19,0)	1,57 (0,83 - 2,98)	0,16		
Ceftriaxona	1 (1,3)	1 (0,6)	2,04 (0,13 - 33,04)	0,55		
Ceepime	34 (43,6)	25 (15,9)	4,08 (2,20 - 7,58)	<0,001	2,77 (1,12 - 6,84)	0,03
Imipenem	25 (32,1)	13 (8,2)	5,26 (2,51 - 11,03)	<0,001	3,21 (1,13 - 9,11)	0,03
Meropenem	13 (16,7)	4 (2,5)	7,70 (2,42 - 24,50)	<0,001		
Ertapenem	1 (1,3)			0,33		
Vancomicina	35 (44,9)	22 (13,9)	5,03 (2,67 - 9,49)	<0,001		
Ciprofloxacino	28 (35,9)	36 (22,8)	1,90 (1,05 - 3,44)	0,03		
Levofloxacino	6 (7,7)	13 (8,2)	0,93 (0,34 - 2,55)	0,89		
Clindamicina	19 (24,4)	15 (9,5)	3,07 (1,46 - 6,45)	0,002		
Metronidazol	10 (12,8)	7 (4,4)	3,17 (1,16 - 8,69)	0,02		
Sulfametoxazol-trimetoprim	2 (2,6)	1 (0,6)	4,13 (0,37 - 46,28)	0,26		
Polimixina B	1 (1,3)			0,33		
Antifúngicos	9 (11,5)	3 (1,9)	6,74 (1,77 - 25,66)	0,002		

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson e tempo sob risco;
OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%; SNC, Sistema Nervoso Central.

Tabela 7. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por VRE somente para os pacientes do HEMA (Hospital Estadual Manoel de Abreu).

Fatores de risco	Análise univariada				Análise Multivariada	
	Casos (n = 44)	Controles (n = 88)	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
<i>Dados demográficos</i>						
Sexo masculino	31 (70,5)	42 (48,8)	2,50 (1,15 - 5,41)	0,02		
Idade (mediana, quartis)	55,5 (48 - 73,5)	50 (37,5 - 69)		0,04		
<i>Comorbidades</i>						
Doença cardíaca	6 (13,6)	6 (7,1)	2,05 (0,62 - 6,79)	0,33		
Doença pulmonar	20 (45,5)	27 (31,8)	1,79 (0,85 - 3,79)	0,13		
Doença renal	1 (2,3)	5 (5,9)	0,37 (0,04 - 3,29)	0,66		
Doença hepática	3 (6,8)	1 (1,2)	6,15 (0,62 - 60,92)	0,12		
Doença do SNC	17 (38,6)	21 (24,4)	1,94 (0,89 - 4,26)	0,09		
Diabetes mellitus	11 (25,0)	18 (21,2)	1,24 (0,53 - 2,93)	0,62		
Neoplasias sólidas		2 (2,3)		0,55		
AIDS	7 (15,9)	21 (24,4)	0,58 (0,23 - 1,51)	0,26		
Trauma		1 (1,2)		1,00		
Índice de comorbidade de Charlson	2 (1 - 4)	1 (1 - 6)		0,24		
<i>Dados de internação</i>						
Internação anterior HEB	2 (4,5)	28 (32,6)	0,10 (0,02 - 0,44)	<0,001		
Tempo sob risco (mediada, quartis)	12,5 (7 - 23)	8 (4 - 14)		0,003		
Transferência imediata	4 (9,1)	11 (12,8)	0,68 (0,20 - 2,28)	0,53		
<i>Imunidade</i>						
Neutropenia	1 (2,3)	1 (1,2)	1,98 (0,12 - 32,38)	1,00		
Uso de esteróide	7 (15,9)	16 (18,6)	0,83 (0,31 - 2,20)	0,7		
<i>Procedimentos e dispositivos</i>						
Cirurgia	10 (22,7%)	15 (17,4)	1,39 (0,57 - 3,42)	0,47		
Gastro-cirurgia		2 (2,3)		0,55		
Amputação	4 (9,1%)	2 (2,3)	4,20 (0,74 - 23,90)	0,18		
Traqueostomia	6 (14,0%)			0,001		
Ventilação mecânica	5 (11,6%)			0,003		
Cateter Venoso Central	5 (11,6%)	2 (2,3)	5,39 (1,00 - 28,99)	0,04		
Sonda Vesical de Demora	12 (27,3%)	25 (29,1)	0,92 (0,41 - 2,06)	0,83		
Uso de drenos	1 (2,3%)			0,33		
<i>Uso de antimicrobianos</i>						
Ampicilina		2 (2,3)		0,55		
Ampicilina-Sulbactam	1 (2,3)			0,33		
Amoxicilina-clavulanato	8 (18,9)	31 (36,0)	0,39 (0,16 - 0,95)	0,04		
Oxacilina	5 (11,6)	2 (2,3)	5,39 (1,00 - 28,99)	0,03	35,27 (2,46 - 505,37)	0,01
Piperacilina-Tazobactam	10 (22,7)	3 (3,5)	8,14 (2,11 - 31,41)	0,001		
Cefalotina	1 (2,3)	3 (3,5)	0,64 (0,064 - 6,30)	1,00		
Cefazolina	1 (2,3)	1 (1,2)	1,98 (0,12 - 32,38)	1,00		
Ceftriaxona	2 (4,5)	3 (3,5)	1,32 (0,21 - 8,19)	1,00		
Ceftazidima	1 (2,3)			0,34		
Cecepime	12 (27,3)	8 (9,3)	3,66 (1,37 - 9,79)	0,007		
Imipenem	10 (22,7)	2 (2,3)	12,35 (2,57 - 59,35)	<0,001		
Meropenem	4 (9,1)			0,01		
Ertapenem	2 (4,5)	2 (2,3)	2,00 (0,27 - 14,70)	0,6		
Vancomicina	14 (31,8)	3 (3,5)	12,91 (3,47 - 48,09)	<0,001		
Linezolida	1 (2,3)			0,34		
Ciprofloxacino	14 (31,8)	13 (15,1)	2,62 (1,10 - 6,23)	0,03		
Levofloxacino	5 (11,6)	10 (11,6)	0,97 (0,31 - 3,05)	0,96		
Clindamicina	7 (15,9)	5 (5,8)	3,07 (0,91 - 10,30)	0,11		
Metronidazol	1 (2,3)	3 (3,5)	0,64 (0,07 - 6,37)	1,00		
Sulfametoxazol-trimetoprim	4 (9,1)	14 (16,3)	0,51 (0,16 - 1,67)	0,26		
Antifungicos	2 (4,5)	10 (11,6)	0,36 (0,08 - 1,73)	0,34		

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson e tempo sob risco;

OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%; SNC, Sistema Nervoso Central.

É interessante notar que a análise univariada do HEMA apresentou dados bem peculiares àquela instituição, como a significância referente à dados demográficos como quanto a ser do sexo masculino ($p=0,02$; OR=2,50; IC95% 1,15-5,41) e à idade ($p=0,04$; OR=indeterminado) e no que se refere a dados de internação, chama-nos à atenção o fato de ser significativo o efeito protetor da internação anterior no HEB ($p<0,001$; OR=0,10; IC95% 0,02-0,44). Entretanto, a análise multivariada indicou como fator de risco para aquisição de VRE no HEMA, somente o uso da oxacilina ($p=0,01$; OR=35,27; IC95% 2,46-505,37) na terapêutica antimicrobiana (**tabela 7**).

Para obtermos os fatores que contribuem para a aquisição de cepas formadoras de “clusters” selecionamos apenas os “casos” e estabelecemos que nossa análise seria dependente da variável “cluster”. O resultado desta etapa demonstrou que pacientes do sexo masculino ($p=0,04$; OR=0,34; IC95% 0,12-0,94), portadores de doença cardíaca ($p=0,03$; OR=0,31; IC95% 0,11-0,91), ou ainda, pacientes que fizeram uso de amoxicilina-clavulanato ($p=0,008$; OR=0,24; IC95% 0,09-0,69), apresentaram uma tendência em não adquirir cepas formadoras de “clusters” (**tabela 8**).

A etapa da análise dos fatores de risco que, mediante o perfil clonal dos isolados, buscou respostas para a aquisição das cepas tipo A do PFGE, as quais formaram o “cluster” mais evidente do estudo, demonstrou que a unidade de internação do HEB, terceiro andar esquerdo, apresentou uma maior circulação do clone *Afm* ($p=0,04$; OR=3,91; IC95% 1,04-14,72), assim como, a traqueostomia ($p=0,02$; OR=8,04; IC95% 1,41-45,95), o uso de ventilação mecânica ($p=0,02$; OR=14,34; IC95% 1,59-129,77) e de antifúngicos ($p=0,03$; OR=9,99; IC95% 1,24-80,20) apresentaram-se significantes como fatores de risco para a aquisição do clone *Afm*, conforme os resultados das análises, exibidos na **tabela 9**.

Ao avaliarmos se houve algum fator predisponente para o carreamento ou a infecção por cada espécie de VRE analisada neste estudo, encontramos uma forte relação entre a terapêutica antimicrobiana com levofloxacino e a aquisição da espécie *E.faecalis* ($p=0,001$; OR=14,87; IC95% 3,04-72,75). A análise completa está detalhada na **tabela 10**.

Tabela 8. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por isolados de VRE formadores de “cluster”.

		Análise Univariada			Análise Multivariada	
Fatores de risco	"Cluster" (n = 84)	Não "Cluster" (n = 38)	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
Dados demográficos						
Sexo masculino	51 (58,6)	27 (77,1)	0,42 (0,17 - 1,03)	0,05	0,34 (0,12 - 0,94)	0,04
Idade (mediana)	61 (48-71)	59,5 (52-70)		0,53		
Comorbidades						
Doença cardíaca	11(12,6)	10 (28,6)	0,36 (0,14 - 0,95)	0,04	0,31 (0,11 - 0,91)	0,03
Doença pulmonar	24 (27,6)	15 (42,9)	0,51 (0,22 - 1,15)	0,10		
Doença renal	12 (13,8)	6(17,1)	0,77 (0,27 - 2,25)	0,64		
Doença hepática	9 (10,3)	2 (5,7)	1,90 (0,39 - 9,29)	0,51		
Doença do SNC	22 (25,3)	7 (20,0)	1,35 (0,52 - 3,53)	0,53		
Diabetes mellitus	22 (25,3)	12 (34,3)	0,65 (0,28 - 1,52)	0,32		
Linfomas/Leucemias	3 (3,4)			0,56		
Neoplasias sólidas	6 (6,9)	1 (2,9)	2,52 (0,29 - 21,72)	0,67		
AIDS	5 (5,7)	2 (5,7)	1,01 (0,19 - 5,45)	1,00		
Escore de Charlson (mediana)	2(1-3)	2(1-4)		0,82		
Dados de internação						
Internação anterior HEB	32(36,8)	10(28,6)	1,46 (0,62 - 3,41)	0,40		
Internação interior HEMA	11(12,6)	4(11,4)	1,12 (0,33 - 3,79)	1,00		
Internação na UTI	11 (12,6)	8 (22,9)	0,49 (0,18 - 1,34)	0,16		
Internação no 3º esquerdo	25(28,7)	6(17,1)	1,95 (0,72 - 5,27)	0,18		
Tempo sob risco (mediana)	14(7-30)	16(8-29)		0,86		
Transferência imediata	8 (9,2)	3 (8,6)	1,08 (0,27 - 4,33)	1,00		
Imunidade						
Neutropenia	6 (6,9)	2(5,7)	1,22 (0,24 - 6,37)	1,00		
Uso de esteróide	34 (39,5)	11 (32,4)	1,37 (0,59 - 3,16)	0,46		
Procedimentos e dispositivos						
Cirurgia	42 (48,3)	12 (34,3)	1,79 (0,79 - 4,04)	0,16		
Gastro-cirurgia	7 (8,0)	2 (5,7)	1,44 (0,29 - 7,32)	1,00		
Amputação	9 (10,3)	7 (20,0)	0,46 (0,16 - 1,36)	0,23		
Debridamentos	13 (14,9)	4 (11,4)	1,36 (0,41 - 4,51)	0,78		
Traqueostomia	12 (14,0)	3 (8,6)	1,73 (0,46 - 6,55)	0,55		
Ventilação mecânica	28 (32,6)	8 (22,9)	1,63 (0,64 - 4,04)	0,29		
Cateter Venoso Central	22 (25,3)	7 (20,0)	1,35 (0,52 - 3,53)	0,54		
Sonda Vesical de Demora	41 (47,1)	15 (42,9)	1,19 (0,54 - 2,62)	0,67		
Nutrição parenteral	6 (6,9)	1 (2,9)	2,52 (0,29 - 21,72)	0,67		
Uso de drenos	4 (4,6)	1 (2,9)	1,64 (0,18 - 15,20)	1,00		
Uso de antimicrobianos						
Ampicilina		1 (2,9)		0,29	0,24 (0,09 - 0,69)	0,008
Ampicilina-Sulbactam	2 (2,3)	2(5,7)	0,39 (0,05 - 2,87)	0,58		
Amoxilina-clavulanato	12(13,8)	11 (31,4)	0,35 (0,14 - 0,89)	0,06		
Oxacilina	5 (5,8)	2 (5,7)	1,02 (0,19 - 5,52)	1,00		
Piperacilina-Tazobactam	22 (26,4)	12(31,4)	0,78 (0,33 - 1,85)	0,58		
Cefalotina	4(4,6)	3 (8,6)	0,51 (0,11 - 2,43)	0,41		
Cefazolina	18 (20,7)	4 (11,4)	2,02 (0,63 - 6,47)	0,23		
Ceftriaxona	1 (1,1)	2 (5,7)	0,19 (0,02 - 2,19)	0,20		
Ceftazidima		1 (2,9)		0,29		
Ceepime	34 (39,1)	12 (34,3)	1,23 (0,54 - 2,79)	0,62		
Imipenem	25 (28,7)	10 (28,6)	1,01 (0,42 - 2,40)	0,99		
Meropenem	13 (14,9)	4 (11,4)	1,36 (0,41 - 4,51)	0,78		
Ertapenem	1(1,1)	2(5,7)	0,20 (0,02 - 2,19)	0,20		
Vancomicina	34 (39,1)	15 (42,9)	0,86 (0,39 - 1,90)	0,70		
Linezolida		1 (2,9)		0,30		
Ciprofloxacino	30 (34,5)	12 (34,3)	1,20 (0,44 - 2,31)	0,98		
Levofloxacino	7 (8,0)	4 (11,4)	0,68 (0,19 - 2,48)	0,73		
Clindamicina	17 (19,5)	9 (25,7)	0,70 (0,28 - 1,77)	0,45		
Metronidazol	8 (9,2)	3 (8,6)	1,08 (0,27 - 4,33)	1,00		
Sulfametoxazol-trimetoprim	3 (3,4)	3 (8,6)	0,38 (0,07 - 1,99)	0,35		
Polimixina B		1 (2,9)		0,30		
Antifúngicos	9 (10,3)	2 (5,7)	1,90 (0,39 - 9,29)	0,51		

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson e tempo sob risco;

OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Tabela 9. Análise dos fatores de risco para infecção ou colonização por cepas de VRE do tipo *Afm* da tipagem PFGE.

Fatores de risco	Análise Univariada				Análise Multivariada	
	PFGE Tipo <i>Afm</i> (n = 36)	PFGE Tipo não- <i>Afm</i> (n = 86)	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
<i>Dados demográficos</i>						
Sexo masculino	21 (58,3)	57 (66,3)	0,71 (0,32 - 1,58)	0,41		
Idade (mediana, quartis)	61 (48-71)	60 (51-72)		0,99		
<i>Comorbidades</i>						
Doença cardíaca	3 (8,3)	18 (20,9)	0,34(0,09 - 1,25)	0,09		
Doença pulmonar	11 (30,6)	28 (32,6)	0,91 (0,39 - 2,11)	0,83		
Doença renal	4 (11,1)	14 (16,3)	0,64 (0,20 - 2,11)	0,46		
Doença hepática	4 (11,1)	7 (8,1)	1,41 (0,39 - 5,15)	0,73		
Doença do SNC	8 (22,2)	21 (24,4)	0,88 (0,35 - 2,24)	0,8		
Diabetes mellitus	12 (33,3)	22 (25,6)	1,46 (0,63 - 3,39)	0,38		
Linfomas/Leucemias	2 (5,6)	1 (1,2)	5,00 (0,44 - 56,97)	0,21		
Neoplasias sólidas	2 (5,6)	5 (5,8)	0,95 (0,18 - 5,15)	1		
AIDS	3 (8,3)	4 (4,7)	1,86 (0,40 - 8,79)	0,42		
Índice de Comorbidade de Charlson	3(1-3)	2(1-4)		0,67		
<i>Dados de internação</i>						
Internação anterior HEB	14 (38,9)	28 (32,6)	1,32 (0,59 - 2,96)	0,5		
Internação anterior HEMA	7 (19,4)	8(9,3)	2,35(0,78 - 7,07)	0,14		
Internação na UTI	4 (11,1)	15 (17,4)	0,59 (0,18 - 1,92)	0,38		
Internação no 3º esquerdo	13(36,1)	18 (20,9)	2,13(0,91 - 5,03)	0,08	3,91 (1,04 - 14,72)	0,04
Tempo sob risco (mediana, quartis)	11(7-23)	16(8-34)		0,51		
Transferência imediata	4 (11,1)	7 (8,1)	1,41 (0,39 - 5,15)	0,73		
<i>Imunidade</i>						
Neutropenia	2 (5,6)	6 (7,0)	0,78 (0,15 - 4,08)	1		
Uso de esteróide	12 (33,3)	33 (39,3)	0,77 (0,34 - 1,75)	0,54		
<i>Procedimentos e dispositivos</i>						
Cirurgia	18 (50,0)	36 (41,9)	1,39 (0,64 - 3,03)	0,41		
Gastro-cirurgia	1 (2,8)	8 (9,3)	0,28 (0,03 - 2,31)	0,28		
Amputação	6 (13,9)	11 (12,8)	1,10 (0,35 - 3,43)	1		
Debridamentos	8 (22,2)	9 (10,5)	2,44 (0,86 - 6,96)	0,09		
Traqueostomia	7 (19,4)	8 (9,4)	2,32(0,77 - 6,98)	0,14	8,04 (1,41 - 45,95)	0,02
Ventilação mecânica	14 (38,9)	22 (25,9)	1,82(0,80 - 4,17)	0,15	14,34 (1,59 - 129,77)	0,02
Cateter Venoso Central	8 (22,2)	21 (24,4)	0,88 (0,35 - 2,24)	0,8		
Sonda Vesical de Demora	17 (47,2)	39 (45,3)	1,08 (0,49 - 2,35)	1		
Nutrição parenteral	2 (5,6)	5 (5,8)	0,95 (0,18 - 5,15)	1		
Uso de drenos	1 (2,8)	4 (4,7)	0,57 (0,06 - 5,43)	1,00		
<i>Uso de antimicrobianos</i>						
Ampicilina		1 (1,2)		1,00		
Ampicilina-Sulbactam		4 (4,7)		0,32		
Amoxilina-clavulanato	6 (16,7)	17 (19,8)	0,81 (0,29 - 2,26)	0,69		
Oxacilina	3 (8,6)	4 (4,7)	1,92 (0,41 - 9,07)	0,41		
Piperacilina-Tazobactam	10 (27,8)	24 (27,9)	0,99 (0,42 - 2,37)	0,99		
Cefalotina	3 (8,3)	4 (4,7)	1,86 (0,40 - 8,79)	0,42		
Cefazolina	6 (16,7)	16 (18,6)	0,88 (0,31 - 2,45)	0,8		
Ceftriaxona		3 (3,5)		0,55		
Ceftazidima		1 (1,2)		1,00		
Ceepime	10(27,8)	36(41,9)	0,53(0,23 - 1,25)	0,14		
Imipenem	11 (30,6)	24 (27,9)	1,14 (0,49 - 2,66)	0,77		
Meropenem	3 (8,3)	14 (16,3)	0,47 (0,13 - 1,74)	0,15		
Ertapenem		3 (3,5)		0,55		
Vancomicina	12 (33,3)	37 (43,0)	0,66 (0,29 - 1,49)	0,32		
Linezolida		1 (1,2%)		1,00		
Ciprofloxacino	10 (27,8)	32 (37,2)	0,65 (0,28 - 1,52)	0,32		
Levofloxacino	1(2,8)	10(11,6)	0,22(0,03 - 1,76)	0,17		
Clindamicina	9 (25,0)	17 (19,8)	1,35 (0,54 - 3,40)	0,52		
Metronidazol	1(2,8)	10(11,6)	0,22(0,03 - 1,76)	0,17		
Sulfametoxazol-trimetoprim	2 (5,6)	4 (4,7)	1,21 (0,21 - 6,90)	1		
Polimixina B		1 (1,2)		1,00		
Antifúngicos	6 (16,7)	5 (5,8)	3,24(0,92 - 11,41)	0,08	9,99 (1,24 - 80,20)	0,03

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson e tempo sob risco;

OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Tabela 10. Análise geral dos fatores de risco para infecção ou colonização por isolados de *Enterococcus faecalis* Resistentes à Vancomicina.

Fatores de risco	Análise Univariada				Análise Multivariada	
	<i>E. faecalis</i> (n = 16)	<i>E. faecium</i> (n = 106)	OR (CI95%)	p	OR (CI95%)	p
<i>Dados demográficos</i>						
Sexo masculino	10(62,5)	68 (64,2)	0,93(0,31 - 2,76)	0,9		
Idade (mediana, quartis)	61,5 (50,5-77)	61 (50-70)		0,46		
<i>Comorbidades</i>						
Doença cardíaca	3 (18,8)	18 (17,0)	1,13 (0,29 - 4,37)	0,55		
Doença pulmonar	7 (43,8)	32 (30,2)	1,79 (0,62 - 5,25)	0,28		
Doença renal	1 (6,3)	17 (16,0)	0,35 (0,04 - 2,82)	0,27		
Doença hepática	9 (12,5)	9 (8,5)	1,54 (0,30 - 7,87)	0,44		
Doença do SNC	5 (31,3)	24(22,6)	1,55 (0,49 - 4,91)	0,32		
Diabetes mellitus	2 (12,5)	32 (30,2)	0,33 (0,07 - 1,54)	0,12		
Linfomas/Leucemias		3 (2,8)		0,65		
Neoplasias sólidas		7 (6,6)		0,36		
AIDS		7 (6,6)		0,36		
Índice de comorbidade de Charlson	2 (1 - 4)	2(1 - 3)		0,29		
<i>Dados de internação</i>						
Internação anterior HEB	3 (18,8)	39 (36,8)	0,40 (0,11 - 1,48)	0,16		
Internação anterior HEMA	1 (6,3)	14 (13,2)	0,44 (0,79 - 1,08)	0,43		
Internação na UTI	4(25,0)	15 (14,2)	2,02 (0,58 - 7,10)	0,26		
Internação no 3º esquerdo	3 (18,8)	18 (17,0)	0,64 (0,17 - 2,42)	0,51		
Tempo sob risco (mediada, quartis)	14,5 (8 - 24,5)	15 (7 - 30,5)		0,75		
Transferência imediata	1 (6,3)	10 (9,4)	0,64 (0,08 - 5,37)	0,56		
<i>Imunidade</i>						
Neutropenia		8 (7,5)		0,31		
Uso de esteróide	5 (31,3)	40 (38,1)	0,81 (0,26 - 2,55)	0,72		
<i>Procedimentos e dispositivos</i>						
Cirurgia	3 (18,8)	51 (48,1)	0,25 (0,07 - 0,92)	0,03		
Gastro-cirurgia		9 (8,5)		0,27		
Amputação		16 (15,1)		0,09		
Debridamentos	1 (6,3)	16 (15,1)	0,38 (0,05 - 3,04)	0,31		
Traqueostomia		15 (14,2)		0,12		
Ventilação mecânica	3 (18,8)	33 (31,1)	0,55 (0,15 - 2,10)	0,29		
Cateter Venoso Central	3 (18,8)	26 (24,5)	0,71 (0,19 - 2,69)	0,44		
Sonda Vesical de Demora	9 (12,5)	47 (44,3)	1,61 (0,56 - 4,66)	0,37		
Nutrição parenteral		7 (6,6)		0,36		
Uso de drenos	1 (6,3)	4 (3,8)	1,70 (0,18 - 16,65)	0,51		
<i>Uso de antimicrobianos</i>						
Ampicilina		1 (0,9)		0,87		
Ampicilina-Sulbactam		4 (3,8)		0,57		
Amoxilina-clavulanato	3 (18,8)	20 (18,9)	0,99 (0,26 - 3,81)	0,65		
Oxacilina	1 (6,3)	6 (5,7)	1,10 (0,12 - 9,79)	0,64		
Piperacilina-Tazobactam	2 (12,5)	32 (30,2)	0,33 (0,07 - 1,54)	0,12		
Cefalotina		7 (6,6)		0,36		
Cefazolina	2 (12,5)	20 (18,9)	0,61 (0,13 - 2,92)	0,42		
Ceftriaxona		3 (2,8)		0,65		
Ceftazidima		1 (0,9)		0,87		
Ceepime	6 (37,5)	40 (37,7)	0,99 (0,33 - 2,93)	0,99		
Imipenem	1 (6,3)	34 (32,1)	0,14 (0,02 - 1,11)	0,03		
Meropenem		17 (16,0)		0,08		
Ertapenem	1 (6,3)	2 (1,9)	3,47 (0,30 - 40,61)	0,35		
Vancomicina	2 (12,5)	47 (44,3)	0,18 (0,04 - 0,83)	0,02		
Linezolida		1 (0,9)		0,87		
Ciprofloxacino	6 (37,5)	36 (34,0)	1,17 (0,39 - 3,47)	0,78		
Lewofloxacino	5 (31,3)	6 (5,7)	7,57 (1,98 - 28,94)	0,006	14,87 (3,04 - 72,75)	0,001
Clindamicina	2 (12,5)	24 (22,6)	0,49 (0,10 - 2,30)	0,29		
Metronidazol	1 (6,3)	10 (9,4)	0,64 (0,08 - 5,37)	0,56		
Sulfametoxazol-trimetoprim		6 (5,7)		0,42		
Polimixina B		1 (0,9)		0,87		
Antifúngicos		11 (10,4)		0,2		

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson e tempo sob risco;

OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

4.5. Prognóstico da colonização ou infecção por VRE

A análise do prognóstico demonstrou que tanto o carreamento quanto a infecção clínica por VRE não tiveram influência na ocorrência de óbitos (**tabela 11**).

Os fatores que realmente apresentaram efeito sobre a variável óbito foram a idade mais avançada, as comorbidades, o índice de Charlson, o uso de dispositivos e cirurgias, conforme exibido na **tabela 11**.

Tabela 11. Análise do prognóstico da infecção ou colonização por VRE, considerando os pacientes de ambos hospitais de estudo.

Fatores de Risco	Análise Univariada				Análise Multivariada	
	Óbitos (n=67)	Outras saídas (n=299)	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Carreamento de VRE	33 (49,3)	89 (29,8)	2,29 (1,34-3,93)	0,002	1,12 (0,52-2,43)	0,8
Cultura clínica para VRE	2 (2,9)	5 (1,6)	1,81 (0,24-9,37)	0,5		
<i>Dados demográficos</i>						
Sexo Masculino	38 (56,3)	163 (54,5)	1,09 (0,64-1,87)	0,7		
Idade (mediana, quartis)	65 (53-74)	57,5 (45-71)	...	0,01	1,02 (1,001-1,04)	0,04
<i>Local de internação</i>						
Hospital Estadual Bauru*	14 (20,9)	116 (38,8)	2,38 (1,28-4,76)	0,006		
Transferido de outro hospital	4 (6,0)	18 (6,0)	0,99 (0,32-3,03)	1		
<i>Comorbidades</i>						
Doença Cardíaca	8 (11,9)	46 (15,5)	0,74 (0,33-1,65)	0,5	0,53 (0,19-1,47)	0,2
Doença Pulmonar	25 (37,3)	80 (26,9)	1,62 (0,93-2,82)	0,09		
Doença Renal	18 (26,9)	31 (10,4)	3,16 (1,64-6,10)	<0,001		
Doença Hepática	8 (11,9)	11 (3,6)	3,54 (1,36-9,17)	0,006	4,42 (1,10-17,74)	0,04
Diabetes mellitus	13 (19,4)	67 (22,5)	0,83 (0,43-1,61)	0,6		
Doença do SNC	18 (26,9)	46 (15,4)	2,02 (1,08-3,77)	0,03	2,27 (0,97-5,32)	0,06
Neoplasia Sólida	9 (13,4)	17 (5,7)	2,57 (1,09-6,06)	0,04	4,04 (1,18-13,78)	0,03
Linfoma ou Leucemia	3 (4,5)	2 (0,7)	6,96 (1,14-42,51)	0,045	75,13 (3,16-1785,19)	0,008
Aids	2 (3,0)	29 (9,7)	0,29 (0,07-1,23)	0,07		
Trauma	0 (0,0)	16 (5,4)	0,0 (indefinido)	0,051		
Índice de Comorbidade de Charlson	3 (1-4)	1 (1-3)	...	<0,001		
<i>Dados da internação</i>						
Neutropenia	3 (4,5)	16 (5,4)	0,83 (0,23-2,92)	1	0,17 (0,01-2,26)	0,2
Uso de esteróides	34 (51,4)	68 (22,8)	3,59 (2,07-6,25)	<0,001	1,42 (0,65-3,10)	0,4
Ventilação Mecânica	39 (58,2)	22 (7,4)	17,47 (9,11-33,52)	<0,001	5,77 (1,76-18,91)	0,004
Cateter Venoso Central	37 (55,2)	27 (9,0)	12,43 (6,66-23,17)	<0,001	1,44 (0,46-4,52)	0,5
Sonda Vesical de Demora	54 (80,6)	81 (27,1)	11,18 (5,80-21,57)	<0,001	4,63 (1,85-11,59)	0,001
Drenos	4 (6,0)	2 (0,7)	9,42 (1,69-52,60)	0,01		
Nutrição Parenteral	5 (7,5)	5 (1,7)	4,74 (1,33-16,88)	0,02		
Cirurgia	28 (41,8)	115 (38,5)	1,15 (0,67-1,97)	0,6	0,53 (0,24-1,20)	0,1

Obs: Onde há parênteses, considerar valor percentual, exceto para idade, índice de Comorbidade de Charlson, tempo sob risco e IC95%;

OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Historicamente, o primeiro isolado de VRE detectado tanto no HEB quanto no HEMA surgiu em 16 de janeiro de 2010, o qual deu início a este estudo quase 13 anos após o primeiro surto ocorrido em São Paulo descrito por Zanela *et al*¹². No entanto, com o fato de que o primeiro diagnóstico de VRE ocorreu através de uma infecção clínica, não se pode dizer ao certo em que momento os primeiros pacientes das instituições estudadas foram colonizados. De acordo com Chavers *et al*²⁸, em um levantamento realizado sobre a contaminação ambiental do VRE, os reservatórios foram inúmeros, inclusive jalecos, portas, mesas, telefones, glicosímetros, termômetros, estetoscópios, etc., e ainda, de acordo com o estudo de Gastmeier *et al*⁴⁸, a média de sobrevivência do *E.faecium* no ambiente é de mais de 60 dias, e do *E.faecalis* de 31 dias. Tais evidências demonstram a facilidade de carreamento do VRE no ambiente hospitalar.

Um achado importante é o fato de 97,5% dos casos do HEMA e 87,5% dos casos do HEB serem autóctones, o que reforçou nossa busca ativa por fatores de risco para o carreamento do VRE em procedimentos, uso de dispositivos e terapêuticas adotadas nas instituições de estudo, adicionados de outras variáveis como comorbidades, transferências e internações anteriores^{30,31,32}.

Quanto às proporções das espécies de *Enterococcus spp* recuperadas das culturas, tanto clínicas como de vigilância, podemos considerar o relato de Chavers *et al*²⁸, que descreve que o *E. faecalis* representava cerca de 90% dos isolados de *Enterococcus spp*, no entanto, a proporção de *E. faecium* tem crescido simultânea à diminuição da proporção de *E. faecalis* nos EUA, Canadá, América Latina, Europa e Ásia com o aparecimento da resistência antimicrobiana nesses isolados. A propensão do *E.faecium* em participar de diversas formas de conjugação que pode resultar na proliferação de genes de resistência, parece ser maior. Tais mecanismos estão descritos no estudo recente de Freitas *et al*³³ e explicam então, a predominância de *E.faecium* entre os isolados resistentes à vancomicina de nosso estudo, o qual representou 86,9% dos *Enterococcus* frente a 13,1% de *E. faecalis*.

Da mesma forma que o estudo realizado por Shokoohizadeh *et al*³⁵, no qual os autores investigaram a disseminação de VRE através da análise de amostras clínicas de pacientes internados em vários hospitais de ensino de Teheran-Iran e encontraram uma distribuição policlonal, com predominância de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina,

pertencentes ao fenótipo *VanA*, nos vários hospitais e dentre os clones isolados, pôde-se evidenciar a circulação de “clusters” entre as instituições hospitalares, é importante observar que, semelhantemente, nosso estudo encontrou dados coerentes a tais achados (**tabela 3**).

O “cluster” com PFGE tipo *Afm*, além de abranger a cepa emergente, isolada no primeiro caso no HEB, compõe o “cluster” dominante em ambas as instituições. Não somente o tipo *Afm*, mas os tipos *Bfm*, *Cfm*, *Efm*, *Ffm* e *Afc* foram caracterizados por nosso critério arbitrário como “clusters”, os quais circularam tanto no HEB, quanto no HEMA, reforçando a existência de transmissão cruzada entre as duas instituições consorciadas. Os demais tipos de isolados formadores de “clusters”, *Dfm* e *Gfm*, circularam entre os pacientes internados no HEB e ainda temos o fato de que os tipos PFGE *Afm*, *Cfm* e *Gfm* foram detectados em pacientes designados do grupo EXTERNO, sinalizando a possibilidade de que tais cepas tenham sido importadas de outras instituições. Os isolados dos tipos PFGE *Hfm* até *Z3fm*, não foram formadores de “clusters” e alguns apareceram apenas em uma das instituições conforme exposto na **tabela 3**.

Ao realizarmos uma análise univariada entre os casos de VRE dos dois hospitais do estudo, relacionando a ocorrência dos fatores estudados em ambos, a mesma mostrou resultados que evidenciaram as diferenças estruturais e de especialidades dos mesmos. Por exemplo, a diferença entre o uso de dispositivos como cateteres venosos centrais, ventilação mecânica e sondas vesicais de demora, ou ainda, as cirurgias mostrou a influência das diferenças estruturais com presença de centros cirúrgicos e UTI’s no HEB, que é o hospital de maior porte (**tabela 4**). Por outro lado, diferenças quanto às comorbidades como doença pulmonar, renal e do SNC, neoplasias e AIDS, ou ainda, a diferença na antibioticoterapia com cefazolina (**tabela 4**), demonstram as diferenças das especialidades das duas instituições. Quanto a esta questão, o estudo publicado por Lee *et al*³⁴ evidenciou a transmissão e o controle da infecção ou colonização por VRE em hospitais da Califórnia (EUA) e observou a influência das características de cada hospital sobre a transmissão.

A análise univariada de todos os “casos” e “controles” incluídos no estudo exibiu muitos fatores significativos (**tabela 5**), sendo que, os que mais se destacaram, como tempo sob risco, procedimentos de amputação de membros, debridamentos de escaras e feridas, traqueostomia, e ainda, o uso de ventilação mecânica (todos $p < 0,001$), apontaram para pacientes de maior gravidade, complexidade e com necessidades de cuidados intensivos, como no caso da

traqueostomia e da ventilação mecânica, o que mostrou coerência com a significância do coeficiente de Chalsom ($p=0,004$). No entanto, foi a análise multivariada que definiu as variáveis indicadas como fatores de risco e serão discutidas a seguir.

Um estudo de caso-controle realizado por Shorman & Al-Tawfiq³⁶, que se assemelhou ao nosso estudo por ter utilizado dois controles pareados com cada caso, encontrou na análise univariada fatores de risco também relacionados com a gravidade do paciente, e ainda, dentro seus achados, alguns antibióticos que se relacionam com nossos achados do mesmo tipo de análise (**tabela 5, análise univariada**), dentre os quais estão a piperacilina-tazobactam, as quinolonas (ciprofloxacina) e a vancomicina.

Em sua conclusão, Shorman & Al-Tawfiq³⁶ comentam que numerosos estudos exploram o papel do uso prévio de antimicrobianos como um fator de risco para a colonização ou infecção nosocomial por VRE, no entanto, os resultados são contraditórios. Embora o resultado de nossa análise univariada tenha se assemelhado em várias respostas, ao estudo supracitado, a análise multivariada apontou como resultado final uma realidade um pouco diferente, indicando o uso prévio de cefepime (antimicrobiano empírico amplamente utilizado) e agentes com atividade anti-anaeróbia como piperacilina-tazobactam e imipenem como fatores de risco (**tabela 5**). Mesmo assim, encontramos evidências na literatura de achados semelhantes, pois Bradley³⁷ reportou um declínio nas taxas de infecções e colonizações por VRE em uma unidade de oncologia, após substituir o uso de piperacilina-tazobactam por ceftazidima, Nourse *et al*³⁸, relata ter diminuído as infecções por VRE após implantar restrições para o uso de cefalosporinas (nas quais o cefepime está incluído) e de glicopeptídeos. Temos ainda o relato de Donskey *et al*³⁹, o qual indica o uso de imipenem e piperacilina-tazobactam como fatores de risco para aumento da colonização fecal por VRE.

Nossa análise multivariada ainda indicou o uso de ventilação mecânica como fator de risco e entendemos que esta expressa o efeito de vários fatores relacionados com gravidade em conjunto, os quais apresentaram significância apenas na análise univariada (**tabela 4**), por exemplo, o índice de comorbidade de Charlson, tempo sob risco, uso de esteróides, nutrição parenteral e mesmo, o uso de vancomicina e estes fatores têm sido comuns em estudos como de Iosifidis *et al*³⁰ e na revisão de Chavers *et al*²⁸. Ainda temos de considerar que pacientes em uso de ventilação mecânica, muitas vezes, por motivos de instabilidade em seu estado clínico geral, sofrem várias transferências intra-hospitalares, principalmente entre setor e UTI,

o que pode aumentar o risco de transmissão pelo contato com ambientes e equipes de profissionais diferentes²⁸.

Ao analisarmos as duas instituições separadamente, encontramos algumas diferenças bem interessantes mas que estão em conformidade com a análise descrita na **tabela 3**, onde comparamos os fatores incluídos no estudo entre o HEB e o HEMA, pois relacionam-se com as diferenças estruturais e de especialidades das instituições. O primeiro achado que apresentou significância apenas no HEMA, foi com relação aos dados demográficos, ser do sexo masculino parece ter favorecido a aquisição de VRE naquela instituição, mas tal achado não foi evidenciado através de nenhum dos estudos relacionados em nossas referências^{30,31,36,38}, no entanto, Park *et al*⁴¹, da mesma forma que em nosso estudo, encontrou que a idade mediana dos “casos” foram superiores a dos “controles”, mas em nosso caso, após a análise multivariada, tais resultados tornaram-se irrelevantes.

Por outro lado, a comorbidade diabetes mellitus e o uso de glicopeptídeos (em nosso caso a vancomicina), resultados significantes na análise univariada do HEB (**tabela 6**), também mostrou-se um achado importante no estudo de Park *et al*⁴¹, no entanto, ao realizarmos a análise multivariada para estabelecermos finalmente os fatores de risco relevantes, tais variáveis não mantiveram sua significância.

Por fim, ainda considerando os resultados da análise independente de cada fator, dentre todos os temas analisados para cada instituição, um fato interessante foi encontrar significância na internação anterior no HEMA e a transferência imediata como fator de risco para o HEB e simultaneamente, a internação anterior no HEB como fator protetor para o HEMA. Tal achado permitiu que criássemos uma imagem do fluxo de circulação do VRE entre as duas instituições, muito mais direcionado no sentido HEMA para o HEB do que o contrário, e ainda, a instituição de maior porte estaria influenciando a de menor porte, conforme previsto no estudo de Lee *et al*³⁴, mas em nosso caso, esta influência tem seu caráter positivo.

Os resultados finais, com os quais estabeleceram os fatores de risco para aquisição de infecção nosocomial ou colonização por VRE no HEB (**tabela 6**), mostraram um perfil muito semelhante ao resultado geral (incluindo os dois hospitais), exceto quanto ao uso de esteroides, o qual aparece nos resultados para o HEB, mas este achado não é comum na literatura, pois dentre a literatura recente, Gudiol *et al*⁴², encontraram significância para o uso

prévio de esteroides, no entanto, para *E. faecium* sensíveis à vancomicina em pacientes com câncer, o que não se observou em nosso estudo. Em resultados anteriores já comentamos a relação entre o uso de esteroides com ventilação mecânica como fator de risco, bem como outros fatores relacionados com gravidade em conjunto em estudos como de Iosifidis *et al*³⁰ e na revisão de Chavers *et al*²⁸, o que é perfeitamente compreensível e explica este resultado. A ventilação mecânica, o uso prévio de cefepime e de imipenem como fatores de risco.

Nosso estudo indicou que o uso prévio de oxacilina foi capaz de influenciar a epidemiologia do VRE no HEMA (**tabela 7**), dado quase não exibido na literatura, no entanto, alguns autores afirmam que as questões relacionadas à determinação do uso prévio de antimicrobianos como fator de risco para a infecção ou colonização por VRE tem sido um tanto conflitante, como por exemplo, Chavers *et al*²⁸, chegam a afirmar que as discrepâncias nesses resultados parecem ocorrer por diferenças no delineamento dos estudos, confusão por tempo de internação hospitalar e, presumivelmente, viés de publicação, ou seja, estudos com associações positivas são mais propensos a serem aceitos para publicação em revistas e jornais do que estudos que exibem resultados nulos. Harbarth *et al*⁴³ concluem que a terapêutica antimicrobiana pode influenciar a transmissão do VRE em diferentes níveis, diminuindo a resistência contra a colonização no trato gastrointestinal, ou aumentando a suscetibilidade a tornar-se colonizado, ou ainda, em um paciente já colonizado com VRE, a exposição a antibióticos pode inibir outras bactérias e aumentar o crescimento excessivo de VRE no intestino, etc.

Um ponto interessante do estudo foi o achado que determinou o uso prévio de amoxicilina-clavulanato como fator protetor na transmissão de cepas de VRE formadoras de “cluster” (**tabela 8**), sendo este, totalmente coerente com o que descreve Harris *et al*⁴⁴, em um estudo em que procura diferenciar as causas exógenas e endógenas que favorecem a aquisição de cepas resistentes. Causas exógenas, ou seja, através de equipamentos, superfícies do ambiente e pessoa a pessoa, favorecem a transmissão de “clusters”, por outro lado, causas endógenas pode ter como exemplo o desenvolvimento da resistência por pressão da terapêutica antimicrobiana e é neste ponto que o efeito protetor da amoxicilina-clavulanato ganha coerência quando consideramos a aquisição de isolados formadores de “clusters”. Por outro lado, nossos achados demonstram que pacientes do sexo masculino e com doença cardíaca como comorbidade tiveram uma tendência menor em adquirir VRE por transmissão

cruzada do que os outros pacientes. Esta última informação adicionada do fato de que não foi observado carregamento de VRE na unidade coronariana (**figura 4**), sugere que tal unidade possa apresentar exemplos de medidas de controle a serem seguidos.

Um dos fatores de risco mais evidentes no estudo, a ventilação mecânica, também foi confirmado como capaz de favorecer a colonização ou infecção com o “cluster” mais incidente do mesmo estudo, o Tipo *Afm* definido através da tipagem PFGE. Este achado reforça a evidência de que grande parte da transmissão do VRE nas instituições de estudo se deu de forma exógena, ou seja, pessoa-a-pessoa, através das mãos dos profissionais de saúde, equipamentos e dispositivos médicos, superfícies, entre outros. O estudo de Rossini *et al*⁴⁵, por exemplo, também obteve em análise multivariada por regressão logística binária, a ventilação mecânica como fator de risco para transmissão nosocomial de VRE e interessante, outros fatores relacionados à gravidade do paciente⁴⁹ também mostraram-se envolvidos como facilitadores do carregamento do clone *Afm*, como a traqueostomia, o uso de antifúngicos e a internação no 3º andar esquerdo, este último, era definido como o setor preferencial para acolher os pacientes recém liberados da UTI durante o período em que foi realizado este estudo.

Ao investigarmos se houve algum fator que tenha sido capaz de favorecer a infecção ou a colonização por uma das espécies de VRE, encontramos que pacientes que fizeram uso de levofloxacino apresentaram positividade maior para *E.faecalis* ($p = 0,001$). No caso do estudo de Pereira *et al*⁵⁰, indica que há respostas diferentes às medidas de controle da colonização por VRE das duas espécies em estudo, principalmente por diferenças no tempo de sobrevivência no meio ambiente.

A incidência de colonização ou infecção por VRE no HEB, teve seus dois momentos de alerta, em setembro de 2010 e em junho de 2012 (figura 5.a), e no HEMA, em novembro de 2010 o gráfico de controle indica um breve momento crítico, porém, a disseminação manteve-se baixa na maior parte do tempo, como resposta à implantação das medidas de vigilância, como segregação espacial e monitoramento da colonização através de swabs de vigilância. Tais medidas apresentaram coerência com a proposta de Lee *et al*⁴⁶, onde ele relata que para evitar a transmissão cruzada de VRE nas enfermarias do hospital, uma política de controle de infecção por VRE deve incluir colonização assintomática VRE, e assim, a vigilância ativa de

VRE durante a admissão, isolamento subsequente à detecção e as práticas de lavagem das mãos apropriadas são necessárias para evitar a propagação de VRE dentro um hospital.

Quanto ao prognóstico das infecções ou mesmo as colonizações por VRE, nosso estudo reproduziu achados já encontrado em outras investigações, como por exemplo Yoo *et al*⁵¹, pois a aquisição do VRE não exerceu influência sobre o óbito dos casos (**tabela 11**), pudemos observar que a piora do prognóstico foi intensificada por idade avançada, presença de comorbidades e dispositivos relacionados com a gravidade do paciente.

As limitações deste estudo, além do seu delineamento retrospectivo, foram, sem dúvida, o tamanho da amostra, que dependeu do número de casos detectados de VRE, durante o período de estudo.

Durante a fase das análises moleculares entendemos que seria interessante a inclusão de alguns testes moleculares para enriquecimento dos dados epidemiológicos, como o MLST, a detecção molecular do fenótipo *VanA* e do Complexo Clonal (CC)17, que segundo McCracken *et al*⁴⁷, representa uma linhagem de um virulento clone de VRE hospitalar que tem sido observado em todo o mundo. As características do clone CC17 incluem frequentemente fenótipos de resistência à ampicilina e glicopeptídeos, a presença de genes de virulência como *esp* e *hyl* e determinantes da colonização que facilitam sua disseminação hospitalar.

Conclusões

6. CONCLUSÃO

- No período da pesquisa (janeiro/2010 a junho/2012), foram identificados 122 casos de colonização ou infecção por enterococos resistentes à vancomicina (VRE) autóctones nos hospitais do estudo e 8 casos que já carregavam esse patógeno no momento da admissão.
- Dentre os casos autóctones, 113 (86,9%) foram caracterizados como *Enterococcus faecium* e 17 (13,1%) como *Enterococcus faecalis*.
- Em tipagem molecular, 77,0% dos isolados autóctones pertenciam a “clusters”, definidos como padrões eletroforéticos que agrupavam cinco ou mais isolados.
- Em estudo caso-controle que comparou os 122 isolados autóctones a 244 controles, os fatores de risco independentes para infecção e/ou colonização por VRE foram o uso de ventilação mecânica (OR=8,12; IC95% 1,76-37,54; p=0,007) e a terapêutica antimicrobiana com piperacilina-tazobactam (OR=3,62; IC95% 1,62-8,40; p=0,002;), cefepime (OR=2,96; IC95% 1,51-5,82; p=0,002;) e imipenem (OR=3,81; IC95% 1,57-9,24; p=0,003).
- De forma isolada, os casos do HEB apresentaram como fatores de risco o uso de esteroides (OR=2,41; IC95% 1,11-5,23; p=0,03), de ventilação mecânica (OR=6,03; IC95% 1,23-29,47; p=0,03) e a terapêutica antimicrobiana com cefepime (OR=2,77; IC95% 1,12-6,84; p=0,03) e imipenem (OR=2,41; IC95% 1,11-5,23; p=0,03). Para aqueles que adquiriram VRE no HEMA somente o uso da oxacilina (OR=35,27; IC95% 2,46-505,37; p=0,01) foi identificado como fator de risco independente.
- Comparando pacientes carreadores das diferentes espécies, foi identificada relação entre uso de levofloxacino e aquisição de *E. faecalis* (OR=14,87; IC95% 3,04-72,75; p=0,001).
- Também foi identificada tendência significativa a não pertencer a “clusters” entre pacientes do sexo masculino (OR=0,34; IC95% 0,12-0,94; p=0,04), portadores de doença cardíaca (OR=0,31; IC95% 0,11-0,91; p=0,03), ou aqueles que fizeram uso de amoxicilina-clavulanato (OR=0,24; IC95% 0,09-0,69; p=0,008).
- Houve associação independente entre aquisição do clone dominante *Afm* e internação em uma enfermaria específica do HEB (Terceiro Andar, Esquerdo; OR=3,91; IC95%

1,04-14,72; $p=0,04$). Outros fatores associados a esse desfecho foram traqueostomia ($p=0,02$; OR=8,04; IC95% 1,41-45,95), ventilação mecânica (OR=14,34; IC95% 1,59-129,77; $p=0,02$) e uso de antifúngicos (OR=9,99; IC95% 1,24-80,20; $p=0,03$).

- Quanto ao prognóstico, o óbito não foi influenciado pela presença do VRE (infecção ou colonização). Comorbidades, fatores de gravidade e o uso de dispositivos invasivos foram associados a maior risco de morte.
- Tomados em conjunto, os achados apontam para um papel do rastreamento de carreadores (com aplicação de medidas de precaução e isolamento para os colonizados) e das políticas restritivas ao uso de antimicrobianos na prevenção da disseminação de VRE nos hospitais do estudo.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Facklam RR, Sahm DF, Teixeira ALM. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 7th Edition, ASM Press 1999: 297-305.
2. Jett BD, Huycke M, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:462-78.
3. Titze-de-Almeida R, Rollo Fº M, Silveira CAN, Rodrigues IP, Eudes Fº J, Nascimento RS, Ferreira II RF, Moraes LMP, Boelens H, Belkum AV, Felipe MSS. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility of *Enterococci* Recovered from Brazilian Intensive Care Units. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 197-205.
4. Eisenstein BI, Schaechter M. Normal Microbial Flora. In: Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Mechanisms of Microbial Disease, 2th Edition, *Williams & Wilkins* 1993; 2:16-26.
5. Breed RS, Murray EGD, Smith NRG II. *Streptococcus*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th Edition, *Williams & Wilkins* 1957 508-24.
6. Freeman R, Kearns AM, Lightfoot NF. Heat resistance of nosocomial enterococci. *Lancet* 1994; 344: 64-5.
7. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiógrama. *Ed Atheneu* 2005: 43-54.
8. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr, WC. Diagnóstico Microbiológico. 5ª. Ed. *Guanabara Koogan* 2001: 608-10.
9. Hirt H, Erlandsen SL, Dunny GM. Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 Aggregation Substance asc 10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* Contributes to Cell Hydrophobicity Adhesion to Fibrin. *J Bacteriol* 2000; 182: 2299-306.

10. Centikaya Y, Falk P, Mayhall CG, Vancomycin-resistant *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:686-701.
11. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(suppl 3): iii13-iii21.
12. Zanela RC, Brandileone MCC, Bokermann S, Almeida SCG, Valdetaro F, Vitória F, Moreira MFA, Villins M, Salomão R, Pignatari ACC. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. *Microb Drug Res*, 2003; 9: 283-91.
13. Center for Disease Control and Prevention. Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Healthcare Settings 2010. [Online: <http://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>]
14. Toye B, Shimansky J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiologic significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (Possessing the vanC Genotype). *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3166-70.
15. Murray PM, Rosenthal K, Pfaller M. Medical microbiology. 5th Ed. Elsevier 2007; 259-62.
16. Sutter ST, Frei R, Dangel M, Gratwohl A, Bonten M, Widmer AF. Not all patients with vancomycin-resistant enterococci need to be isolated. *Clin Infect Dis* 2010; 51:678–83.
17. Furtado GHC, Martins ST, Coutinho AP, Soares GMM, Wey SB, Medeiros EAS. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. *Rev Saúde Publica* 2005; 39:41-6.
18. Panesso D, Reyes J, Rinco'n S, Díaz L, Galloway-Penã J, Zurita J, Carrillo C, Merentes A, Guzmán M, Adachi JA, Murray BE, Arias CA. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in south american hospitals. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1562-9.

19. Fram D, Castrucci FM, Taminato M, Godoy-Martinez P, Freitas MCS, Belasco A, Sesso R, Pacheco-Silva A, Pignatari AC, Barbosa D. Cross-transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus* in patients undergoing dialysis and kidney transplant. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43:115-9.
20. D'Azevedo PA, Santiago KAS, Furtado GHC, Xavier DB, Pignatari ACC, Titze-de-Almeida R. Rapid Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in rectal samples from patients admitted to intensive care units. *Braz J Infect Dis* 2009;13:289-93.
21. Zimbro MJ, Power DA. Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media. *Bect Dick Co* 2003; 212-3.
22. Clarrigde JE, Pezzlo MT, Kenneth LV. Laboratory diagnosis of urinary tract infections 1987. *Am Soc Microbiol*; 7-9.
23. Bedendo J, Pignatari ACC. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 1269-74.
24. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y, Samore MH. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1055-61.
25. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis.* 1987; 40: 373-383.
26. Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am J Public Health.* 1989; 79: 340-9.
27. Barros MPS. Standardization and evaluation of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique for molecular typing of *Yersinia pestis* strains isolated in the northeast of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2007;49(4):220

28. Chavers LS et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* 2003; 53: 159-71.
29. Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 577-81
30. Iosifidis E et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* outbreak in a neonatal intensive care unit: epidemiology, molecular analysis and risk factors. *Am J Infect Control* 2013; 41; 857-61.
31. Iris NE et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* carrier status in the reanimations units and related risk factors. *Am J Infect Control* 2013; 41; 261-2.
32. Sohn KM, Peck KR, Joo EJ et al. Duration of colonization and risk factors for prolonged carriage vancomycin-resistant enterococci after discharge from the hospital. *Intern J Infect Dis* 2013; 17; e240-6.
33. Freitas AR, Novais C, Tedim AP, Francia MV, Baquero F, et al. Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations. *PLoS ONE* 2013. 8(3): e60589.
34. Lee BY et al. Modeling the regional spread and control of vancomycin-resistant enterococci. *Am J Infect Control* 2013; 41; 668-73.
35. Shokoohizadeh L et al. High frequency distribution of heterogeneous vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) in Iranian hospitals. *Diag Pathol.* 2013; 8; 163-8.
36. Shorman M & Al-Tawfiq JA. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus* in intensive care unit settings in Saudi Arabia. *Interdiscipl Perspect Infect Dis* 2013; 1-4.
37. Bradley SJ. Control of glycopeptide-resistant enterococci in an oncology unit. *Pharmacotherapy* 2000; 20; 203-12.

38. Nourse C, Murphy H, Byrne C et al. Control of a nosocomial outbreak of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric oncology unit: risk factors for colonization. *Eur J Pediatr* 1998; 157; 20-7.
39. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 2000; 343; 1925-32.
40. Zhou Q et al. Factors associated with acquisition of vancomycin resistant enterococci (VRE) in roommate contacts of patients colonized or infected with a VRE in a tertiary care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 398-403.
41. Park I, Park RW, Lim S-K et al. Rectal culture screening for vancomycin-resistant enterococcus in chronic haemodialysis patients: false-negatives rates and duration of colonization. *J Hosp Infect* 2011; 79; 147-50.
42. Gudiol C, Ayats J, Camoez M et al. Increase in bloodstream infection due to vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* in cancer patients: risk factors, molecular epidemiology and outcomes. *PlosOne* 2013; 8(9); e74734.
43. Harbarth S, Cosgrove S, Carmeli Y. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46; 1619-28.
44. Harris AD, Johnson JK, Thom KA et al. Risk factors for development of intestinal colonization with imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit setting. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011 July ; 32(7); 719–22
45. Rossini FAF et al. Successful prevention of the transmission of vancomycin-resistant enterococci in a Brazilian public teaching hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45(2); 184-8.
46. Lee SC, Wu M-S, Shih H-J, et al. Identification of vancomycin-resistant enterococci clones and inter-hospital spread during an outbreak in Taiwan. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13; 163-9.

47. McCracken M, Wong A, Mitchell R et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1999–2009. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68; 1505–9.
48. Gastmeier P, Schwab F, Bärwolff S, Rüden H, Grundmann H. Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. *J Hosp Infect* 2006; 62:181-9.
49. Morris-Downes M, Smyth EG, Moore J, Thomas T, Fitzpatrick F, Walsh J, Caffrey V, Humphreys H. Surveillance and endemic vancomycin-resistant enterococci: Some success in control is possible. *J Hosp Infect* 2010; 75(3): 228-33.
50. Pereira GH, Muller PR, Zanella RC, Lima MJC, Torchio DS, Levin AS. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital: The lack of effect of measures directed mainly by surveillance cultures and differences in response between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Am J Infect Control* 2010; 38(5): 406-9.
51. Yoo JH, Lee DG, Choi SM, Choi JH, Shin WS, Kim M, Yong D, Lee K, Min WS, Kim CC. Vancomycin-resistant Enterococcal Bacteremia in a Hematology Unit: Molecular Epidemiology and Analysis of Clinical Course. *J Korean Med Sci* 2005; 20(2):169-176.
52. Online [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_ihb.html]
53. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis*[online] 2009; 13(2): 90-8

Anexos

ANEXO 01

Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

 **Comitê de Ética em Pesquisa**

Instituto Lauro de Souza Lima
Caixa Postal 3021 – CEP: 17034-971 – Bauru/ SP/ Brasil
Fone: 55 14 3103-5921
Fax: 55 14 3103-5914

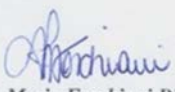
CT.: C.E.P. nº 017/2011 Bauru, 18 de agosto de 2011

Ilma. Sra.
Adriana A. Feltrin Correa
A/C Dr. Carlos Magno C. B. Fortaleza

Prezada Senhora,

O projeto de pesquisa intitulado “Epidemiologia molecular, fatores de risco e prognóstico da infecção por enterococcus ssp. resistentes à vancomicina em situação de introdução recente: um estudo em dois hospitais públicos”, protocolo E-023/11, foi apreciado neste Comitê de Ética em Pesquisa, e foi **APROVADO**.

Aproveitamos a oportunidade para reiterar nossos protestos do mais elevado apreço.
Atenciosamente


Dra Ida Maria Foschiani Dias Baptista
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Lauro de Souza Lima

ANEXO 02

Declaração do Centro de Estudos e Pesquisas do HEB

	Hospital Estadual Bauru Av. Engenheiro Luis Edmundo Carrijo Coube, 1-100 Telefone : (14) 3103-7777 CEP: 17033-360 Bauru/SP	
<u>Declaração</u>		
Declaro que tenho ciência e autorizo, o desenvolvimento da Pesquisa "Epidemiologia Molecular. Fatores de Risco e Prognóstico da Infecção por Enterococcus ssp. Resistentes à Vancomicina em Situação por Introdução Recente: Um Estudo em dois Hospitais Públicos de Bauru, SP", a ser conduzida pela Sra Adriana A Feltrin Correa, junto a esta Entidade, após aprovação do CEP.		
Declaro que conheço, cumprirei e farei cumprir os Requisitos da Resolução 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste Projeto, autorizo sua execução.		
Por ser verdade, firmo a presente.		
Bauru, 01 de Junho de 2011.		
 Roberto Minoru Tani Inoue Presidente da Comissão Científica		

ANEXO 03

Ficha de coleta de dados

Página 01

FICHA N° _____			
CASO () CONTROLE ()			
Nome: _____		Prontuário: _____	
Unidade Hospitalar: _____		Idade: _____	
Sexo: () fem () Masc			
Procedência: () HEB () HEMA () Externo			
DADOS ATÉ A CULTURA			
Admissão no Hospital: ____/____/____		Dias de internação: _____	
na UTI: ____/____/____		Dias de internação: _____	
Outras Movimentações no Hospital:			
Unidade: _____		Admissão: ____/____/____ Saída: ____/____/____	
Unidade: _____		Admissão: ____/____/____ Saída: ____/____/____	
Internações Anteriores: (< 1 ano)			
Neste serviço			
Unidade: _____		Admissão: ____/____/____ Saída: ____/____/____	
Unidade: _____		Admissão: ____/____/____ Saída: ____/____/____	
Em outro serviço - Transferência imediata (S/N): ()			
Hospital: _____		Admissão: ____/____/____ Saída: ____/____/____	
Hospital: _____		Admissão: ____/____/____ Saída: ____/____/____	
Imunidade (S/N): () Neutropenia: _____			
() Esteróides: _____			
() Imunossupressores: _____			
Procedimentos (S/N):			
() Cirurgias: _____		Data: ____/____/____	
		Data: ____/____/____	
		Data: ____/____/____	
() Outros: _____		Data: ____/____/____	
		Data: ____/____/____	
		Data: ____/____/____	
Dispositivos () Respirador () CVC () SVD () NPP			
() Dreno(s): _____			
Úlcera de Pressão: () Sim () Não			
Antimicrobianos:			
1. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			
2. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			
3. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			
4. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			
5. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			
6. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			
7. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			
8. _____ de ____/____/____ a ____/____/____ total: ____ dias			

ANEXO 03

Ficha de coleta de dados

Página 02

Nº da Amostra (LAC): _____ - _____

Data da 1ª cultura positiva: ____/____/____ (caso) Data da última cultura negativa: ____/____/____ (controle)

Material: () vigilância: _____ () clínica: _____

Microrganismo: () *Enterococcus faecium* () *Enterococcus faecalis*

Vancomicina () Sensível () Intermediária () Resistente MIC: _____

Teicoplanina: () Sensível () Intermediária () Resistente MIC: _____

PFGE: Tipo _____

Diagnóstico principal: _____ **CID** _____

Co-morbidades/Charlson score

1 - () IAM () ICC () Doença vascular periférica
 () Demência () DPOC () Doença do tecido conjuntivo
 () Úlcera péptica () Hepatopatia leve
 () Doença cerebrovascular () Diabetes

2 - () Hemiplegia () Doença renal moderada/severa
 () Neoplasia maligna () Leucemia () Linfoma
 () Diabetes com dano de órgão

3 - () Doença hepática moderada/severa

6 - () AIDS () Tumor sólido metastático

Score de Charlson: _____

Outro: () APACHE II: _____ () PRISM: _____ () Outro (_____): _____

Outros dados (antes e após cultura)

Outras culturas clínicas

Microrganismo _____	material _____	data: ____/____/____
Microrganismo _____	material _____	data: ____/____/____
Microrganismo _____	material _____	data: ____/____/____
Microrganismo _____	material _____	data: ____/____/____
Microrganismo _____	material _____	data: ____/____/____
Microrganismo _____	material _____	data: ____/____/____

Infecções Hospitalares (S/N) () :

Sítio: _____	Agente: _____
Data da detecção: ____/____/____	Relação c/ óbito (C/R/N): _____
Sítio: _____	Agente: _____
Data da detecção: ____/____/____	Relação c/ óbito (C/R/N): _____
Sítio: _____	Agente: _____
Data da detecção: ____/____/____	Relação c/ óbito (C/R/N): _____

Antimicrobianos após a cultura:

1. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias
2. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias
3. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias
4. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias
5. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias
6. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias
7. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias
8. _____	de ____/____/____ a ____/____/____	total: ____ dias

Saída : Data: ____/____/____ () Alta () Transferência () Óbito

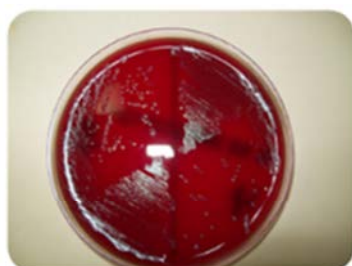
ANEXO 04

Índice de comorbidades de Charlson (ICC)

PESO DO ICC	CONDIÇÃO CLÍNICA (ICC)
1	Infarto do miocárdio Insuficiência cardíaca congestiva Doença vascular periférica Doença cérebro vascular Demência Doença pulmonar crônica Doença do tecido conjuntivo Úlcera Doença crônica do fígado e cirrose Diabetes sem complicação
2	Hemiplegia ou paraplegia Doença renal severa ou moderada Diabetes com complicação Tumor Leucemia Linfoma
3	Doença do fígado severa ou moderada
6	Tumor maligno e metástase AIDS

ANEXO 06

Execução da metodologia de “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (PFGE)



1 - Recuperação dos isolados em Ágar Sangue



2 - Crescimento em caldo BHI



3 - Obtenção do “pellet” de células bacterianas



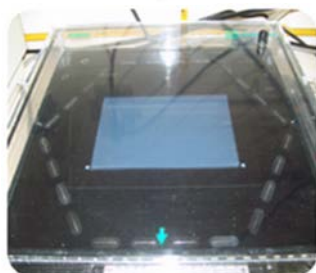
6 - Montagem do Gel contendo os “plugs”



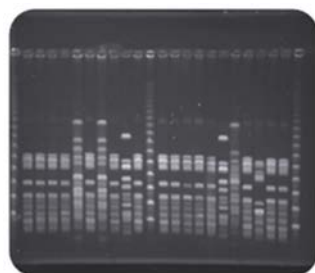
5 - Tratamento dos “plugs” com lysozima, proteinase K e enzima de restrição (*Sma*I)



4 - Preparo dos “plugs” de agarose



7 - PFGE



8 - Tratamento com Brometo de etídio e foto em luz UV