

ALINE GONZALEZ VIGANI

**EPIDEMIOLOGIA CLÍNICA E MOLECULAR DAS
INFECÇÕES DE CORRENTE SANGÜÍNEA
POR *ENTEROCOCCUS FAECALIS* NO COMPLEXO
HOSPITALAR DA UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS, UNICAMP**

CAMPINAS

Unicamp

2008

ALINE GONZALEZ VIGANI

**EPIDEMIOLOGIA CLÍNICA E MOLECULAR DAS
INFECÇÕES DE CORRENTE SANGÜÍNEA
POR *ENTEROCOCCUS FAECALIS* NO COMPLEXO
HOSPITALAR DA UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS, UNICAMP**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em
Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Moretti

Co-Orientadora: Profa. Dra. Raquel Silveira Bello Stucchi

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

V68e

Vigani, Aline Gonzalez

Epidemiologia clínica e molecular das infecções de corrente sanguínea por *Enterococcus faecalis* no complexo hospitalar da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp / Aline Gonzalez Vigani. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Maria Luiza Moretti, Raquel Silveira Bello Stucchi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gentamicina. 2. Infecção hospitalar. 3. Agentes Bacterianos. 3. Resistência Microbiana a medicamentos. 4. Testes de Sensibilidade Microbiana. I. Moretti, Maria Luiza. II. Stucchi, Raquel Silveira Bello. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Clinical and molecular epidemiology of the *Enterococcus faecalis* bloodstream infections at the Universidade Estadual de Campinas Hospital complex

Keywords: • Gentamicin
• Hospital infection
• Antibacterial agents
• Drug Resistance, Microbial
• Microbial Sensitivity Test

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Luiza Moretti
Profa. Dra. Mariângela Ribeiro Resende
Prof. Dr. Plínio Trabazzo
Profa. Dra. Ana Cristina Gales
Profa. Dra. Alcyone Artioli Machado

Data da defesa: 05-12-2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Aline Gonzalez Vigani

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Moretti

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Mariângela Ribeiro Resende

2. Prof. Dr. Plinio Trabasso

3. Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Gales

4. Prof^a. Dr^a. Alcyone Artioli Machado

5. Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Moretti

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/12/2008

DEDICATÓRIA

À Maria Neide,

Filha, irmã, esposa, mãe, sogra e avó que ama profundamente. Esse amor construiu e constrói histórias bonitas e ensinou-me a respeitar e a amar as pessoas, a vida e o mundo. Aprendizado maior que estará eternamente comigo.

À família,

*Vitor, Vicente (**in memorian**), Maria Nilsa, Maria Eunice, Luciane, Maria Carolina e André por vocês existirem na minha vida, por absolutamente todos os momentos que partilhamos, por aprender com cada um de vocês as belezas da vida.*

Ao Alexandre,

Pela amizade e dedicação ao longo da minha formação, o meu agradecimento, a minha admiração.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luiza Moretti, pela orientação, sabedoria compartilhada, oportunidade de realizar esta tese, por todos os momentos despendidos neste trabalho, pela amizade ao longo dos anos.

À Profa. Dra. Raquel Silveira Bello Stucchi, pelo estímulo e apoio desde os meus tempos de residência em infectologia, pela compreensão e amizade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Orlando José Bratfich, pelos preciosos ensinamentos, ajuda prestada, exemplo de dedicação e tempo despendido ao meu lado na bancada do laboratório.

Aos meus amigos, Bárbara Amorin, Rodrigo Angerami e Vera Márcia Rufeisen, que me privilegiam com a sua amizade, sabedoria e apoio há muitos anos.

À Profa. Dra. Priscila Maria Papaiordanou (*in memoriam*), pelo exemplo e estímulo profissional e pessoal que, assim como a saudade, permaneceram presentes durante a realização deste trabalho.

À Nida, acima de tudo, pela amizade e incentivos tão presentes no meu dia-a-dia.

Aos docentes, médicos e demais profissionais da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, pela contribuição à minha formação profissional.

À Câmara de Pesquisa, Serviço de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em especial ao Helymar Machado, pelo auxílio no desenvolvimento das análises estatísticas apresentadas neste estudo.

À Renata Maia e Cristiane Patrícia de Freitas, secretárias da Sub-Comissão de Pós-Graduação em Clínica Médica, pela colaboração na formatação desta tese.

Aos funcionários do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, em especial a Márcia Pedroso e Érivan Ribeiro, pelo apoio.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp por fornecerem as amostras para o banco de bactérias, em especial à Dra. Ângela von Nowakonski, pelos ensinamentos.

Aos pacientes que, com seus rostos, expressões e enfermidades, conduziram-me ao conhecimento humano e científico.

“Precisamos de hábitos que nos ajudem a existir coletivamente. Precisamos de organização, de disciplina. Porém precisamos, também, de espaço para criar, para intervir na ordem das coisas, modificando-as e modificando a nós mesmos. O sujeito humano é, por necessidade interior, um ser inventivo”.

Leandro Konder

	PÁG.
RESUMO.....	xxxi
ABSTRACT.....	xxxv
1- INTRODUÇÃO.....	39
1.1- Introdução geral.....	41
1.2- Microbiologia clínica geral.....	41
1.3- Sítios de infecção.....	44
1.4- Virulência e patogenicidade.....	45
1.5- Epidemiologia molecular.....	47
1.6- Epidemiologia ambiental e hospitalar.....	47
1.7- Tratamento.....	51
1.8- Suscetibilidade antimicrobiana e implicações clínicas.....	52
2- OBJETIVOS.....	57
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1- Local e período de estudo.....	63
3.2- População de estudo.....	63
3.3- Definições.....	63
3.4- Desenho do estudo.....	64
3.5- Métodos laboratoriais.....	65
3.6- Análise estatística.....	67
4- RESULTADOS.....	69
4.1- Características dos pacientes.....	71

4.2- Comparação entre os grupos de pacientes com ICS por <i>E. faecalis</i> com HLGR e sem HLGR.....	74
4.3- Comparação entre pacientes pediátricos e não pediátricos com ICS por <i>E. faecalis</i>.....	80
4.4- Comparação entre os grupos de pacientes com ICS por <i>E. faecalis</i> com evolução para óbito e não óbito.....	84
4.5- Análise de tendência da densidade de incidência de ICS por <i>E. faecalis</i>.....	89
4.6- Análise microbiológica.....	90
4.7- Análise molecular dos isolados.....	92
5- DISCUSSÃO.....	101
6- CONCLUSÕES.....	117
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
8- APRESENTAÇÕES ORIGINADAS POR ESTA TESE DE DOUTORADO.....	139
9- ANEXOS.....	149
Anexo 1- Formulário utilizado para a revisão dos prontuários médicos dos pacientes com hemocultura positiva para <i>E. faecalis</i>.....	151
Anexo 2- Protocolo de extração de DNA para <i>E. faecalis</i> técnica de “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) equipamento CHEF DR III System (Bio Rad).....	153
Anexo 3- Outras co-morbidades presentes.....	157
Anexo 4- Estudos clínicos selecionados em ICS por <i>E. faecalis</i>.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome”, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	“American Type Culture Collection”, Banco Americano de Bactérias
BHI	“Brain Heart infusion”, Meio de Cultura Líquido de Cérebro e Coração
CDC	“Centers for Diseases Control and Prevention”, Centros para o Controle e Prevenção de Doenças
CHEF-DR III	“Contour-Clamped Homogenous Electric Field”, aparato de eletroforese
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CVD	Cateter Vesical de Demora
CVC	Cateter Venoso Central
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EC buffer	Tampão Tris, Cloreto de Sódio, EDTA, Brij58, Desoxicolato de Sódio e Sarkosyl
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ES	Solução de EDTA e Sarkosyl
HC-Unicamp	Hospital de Clínicas – Universidade Estadual de Campinas
HLGR	“High-Level Gentamicin-Resistance”, Alto Nível de Resistência à Gentamicina
IC	Intervalo de Confiança
ICS	Infecção de Corrente Sangüínea
LAP	Leucina Aminopeptidase
NaCl	Cloreto de Sódio

NCCLS	“National Committe for Clinical Laboratories Standards”, Comitê Nacional dos Estados Unidos para Padronização de Laboratórios Clínicos
NNIS	“National Nosocomial Infections Surveillance”, Programa Governamental Norte-Americano para Vigilância de Infecções Hospitalares
OR	Razão de Risco
PBPs	“Penicillin Binding Proteins”, Proteínas Fixadoras de Penicilina
PCR	“Polymerase Chain Reaction”, Reação em Cadeia de Polimerase
PFGE	“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”, Eletroforese em Gel de Campo Pulsátil
PYR	Pirrolidonil Arilamidase
Rpm	Rotações por Minuto
SCOPE	“Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance”, Vigilância e Controle de Patógenos de Interesse
TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
TE	Tampão Tris EDTA
UCO	Unidade Coronariana
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRE	“Vancomycin-Resistant Enterococci”, Enterococo Resistente à Vancomicina

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Pontuação de Charlson para co-morbidades.....	65
Tabela 2- Características demográficas e clínicas dos 145 pacientes (n) com infecção de corrente sanguínea (ICS) por <i>Enterococcus faecalis</i> no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp), janeiro de 1999 a dezembro de 2003..	72
Tabela 3- Procedimentos realizados, dispositivos presentes e uso de antimicrobianos em pacientes (n) com ICS por <i>E. faecalis</i> , HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	73
Tabela 4- Características demográficas e clínicas dos pacientes (n) com ICS por <i>E. faecalis</i> com alto nível de resistência à gentamicina HLGR e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	75
Tabela 5- Procedimento realizado ou dispositivo invasivo presente em pacientes (n) com ICS por <i>E. faecalis</i> HLGR e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	76
Tabela 6- Uso de antimicrobianos em pacientes (n) com ICS por <i>E. faecalis</i> com HLGR e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	78
Tabela 7- Tempo de uso de antimicrobianos em dias antes da identificação do primeiro episódio de ICS por <i>E. faecalis</i> com HLGR e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	79
Tabela 8- Modelo de regressão logística multivariada para ICS por <i>E. faecalis</i> com HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	79

Tabela 9-	Uso de antimicrobianos em pacientes (n) pediátricos não pediátricos com ICS por <i>E. faecalis</i> , HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	82
Tabela 10-	Procedimento realizado ou dispositivo invasivo presente em pacientes (n) pediátricos e não pediátricos com ICS por <i>E. faecalis</i> , HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	83
Tabela 11-	Modelo de regressão logística multivariada para ICS por <i>E. faecalis</i> em pacientes pediátricos, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	83
Tabela 12-	Pacientes (n) com evolução ou não para óbito quanto às características demográficas e internação em unidade de tratamento intensivo (UTI), HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	84
Tabela 13-	Distribuição dos pacientes (n) com evolução ou não para óbito em relação a co-morbidades, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	86
Tabela 14-	Pacientes (n) com evolução ou não para óbito em relação a procedimento realizado ou dispositivo invasivo presente, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	87
Tabela 15-	Pacientes (n) com evolução ou não para óbito em relação à utilização de antimicrobianos, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	88
Tabela 16-	Regressão logística multivariada para óbito por ICS por <i>E. faecalis</i> , HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	89

Tabela 17-	Análise de tendência da resistência antimicrobiana dos isolados (n) de <i>E. faecalis</i> em sangue no HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	91
Tabela 18-	Perfis moleculares obtidos por PFGE de cepas de <i>E. faecalis</i> isolados em sangue no HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n=29.....	99

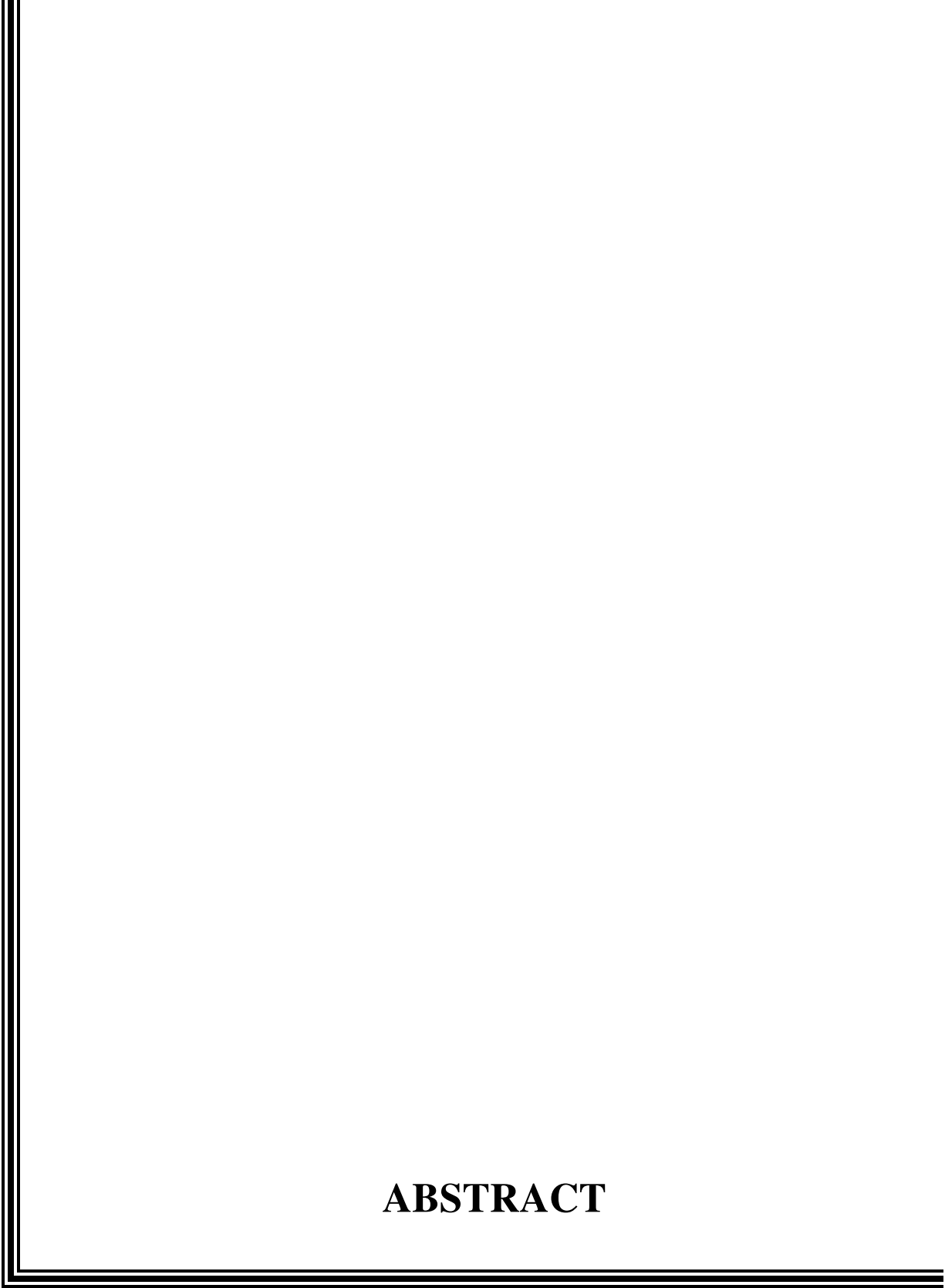
LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Sobrevida acumulada dos pacientes com ICS por <i>E. faecalis</i> com HLGR e sem HLGR por Kaplan-Meier, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	80
Figura 2- Densidade de incidência de ICS por <i>E. faecalis</i> e tendência de casos no HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	90
Figura 3- Resultados dos perfis moleculares de isolados de <i>E. faecalis</i> , HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.....	93
Figura 4- Dendrograma demonstrando os diferentes perfis moleculares das cepas de <i>E. faecalis</i> isoladas em corrente sanguínea, obtidas através da técnica de PFGE, n=45. Figura elaborada pelo programa Biogene [®] software, Vilbert-Loumart, França.....	98

RESUMO

O enterococo é o terceiro agente mais freqüente em infecção de corrente sanguínea (ICS) hospitalar, responsável por 10% dessas infecções e está associado com alta letalidade. Durante as duas últimas décadas, o surgimento de alto nível de resistência à gentamicina (HLGR) e resistência à vancomicina adicionaram desafios ao tratamento das infecções por *Enterococcus faecalis*. Avaliamos as ICSs por *E. faecalis* no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) identificadas de janeiro de 1999 a dezembro de 2003. Nosso objetivo foi determinar as características clínicas, microbiológicas e moleculares das ICSs por *E. faecalis* com HLGR e sem HLGR em pacientes internados no HC-Unicamp. ICS foi definida como pelo menos uma cultura de sangue positiva para *E. faecalis* com ou sem sinais e sintomas associados. Em casos de múltiplos episódios de ICS em um mesmo paciente, somente o primeiro episódio foi considerado. Coletamos informações de prontuários médicos utilizando formulários estruturados. A tipagem molecular de isolados de *E. faecalis* estocados foi realizada através da técnica de eletroforese em gel com campo pulsátil (PFGE). Identificamos 164 pacientes com ICS por *E. faecalis*, dos quais 145 (88,4%) foram incluídos neste estudo. Nossos achados demonstraram que pacientes com ICS por *E. faecalis* são graves. Dentre os 145 pacientes, 128 (88,3%) apresentavam pelo menos uma co-morbidade. Além disso, a realização de procedimento invasivo ou presença de dispositivos invasivos foram freqüentes (75,2%), assim como o uso prévio de antimicrobianos (61,4%). Das 145 ICSs, 66 (45,5%) foram por *E. faecalis* com HLGR e 79 (54,5%) sem HLGR. Na análise univariada, idade avançada, malignidade hematológica, cateterização urinária e uso prévio de cefalosporinas, quinolonas e carbapenêmicos foram mais freqüentes em pacientes com infecção por HLGR quando comparados com pacientes sem HLGR ($p < 0,05$). A análise multivariada mostrou idade avançada, presença de malignidade hematológica e uso prévio de vancomicina como variáveis independentes associadas com infecção por HLGR ($p < 0,05$). A taxa de letalidade foi de 46,2% e não apresentou diferença estatística significativa entre pacientes com infecção por HLGR (50,0%) e sem HLGR (43,0%) ($p = 0,40$). Ventilação mecânica e gravidade das co-morbidades foram associadas com óbito ($p < 0,05$). Durante o período de estudo, a taxa de resistência à ampicilina foi de 2,0%; ciprofloxacina, 51,7%; penicilina, 35,1%; e estreptomicina, 27,6%. Nenhum isolado resistente à vancomicina foi identificado. A genotipagem dos 44 isolados disponíveis (32

de pacientes incluídos no estudo e 12 controles) revelou 29 isolados distribuídos em 11 perfis genotípicos e 15 isolados apresentaram perfis genotípicos únicos e distintos. Alguns isolados geneticamente relacionados eram suscetíveis à gentamicina e outros possuíam HLGR, o que pode ser resultado da transferência de gene plasmidial de resistência HLGR entre isolados. Nossos resultados permitem concluir que ICSs por *E. faecalis* estão associadas com alta taxa de letalidade e são freqüentemente causadas por HLGR. Medidas de controle de infecção, incluindo vigilância ativa, respeito às normas de precauções de contato e uso criterioso de antimicrobianos devem ser consideradas para reduzir o risco de transmissão de *E. faecalis* resistentes em ambiente hospitalar.



ABSTRACT

Enterococcus is the third most frequent agent in nosocomial blood stream infection (BSI), accounting for 10% of nosocomial BSI, and is associated with high mortality. During the last two decades, the emergence of high-level gentamicin resistance (HLGR) and vancomycin resistance added additional challenges in the treatment of *Enterococcus faecalis* infections. We evaluated *E. faecalis* BSI at the Hospital de Clínicas (HC) of the Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) in Brazil between January 1999 and December 2003. We sought to determine the clinical, microbiological, and molecular characteristics of BSI caused by HLGR and non-HLGR strains. *E. faecalis* BSI was defined as at least one positive blood culture for *E. faecalis* during the study period with or without associated symptoms. In patients with multiple BSI episodes, only the first episode was considered. We collected information from medical charts using standard forms. Banked *E. faecalis* isolates were typed using pulsed field gel electrophoresis (PFGE). We identified 164 patients with *E. faecalis* BSI, 145 (88.3%) patients were included in this study. Our data showed that patients with *E. faecalis* BSI are severely ill. One hundred twenty-eight (88.3%) patients had some underlying chronic disease. Invasive procedure or invasive device (75.2%) and previous use of antimicrobial (61.4%) were also frequent. Of the 145 BSIs, 66 (45.5%) were due to HLGR isolates and 79 (54.5%) were non-HLGR. In the univariate analysis, patients with HLGR infection were older, had hematological malignancy, had higher rates of bladder catheterization, and more often had treatment with cephalosporin, quinolone, and carbapenem when compared with non-HLGR infection patients ($p < 0.05$). Multivariate analysis indicated that older age, hematological malignancy, and previous use of vancomycin were independent risk factors associated with HLGR ($p < 0.05$). Mortality rate was 46.2% and was not statistically significantly different among patients with HLGR (50.0%) and non-HLGR (43.0%) infections ($p = 0.40$). Multivariate analysis indicated that mechanical ventilation and severity of underlying chronic diseases were associated with death ($p < 0.05$). During the study period, the prevalence of resistance to ampicillin was 2.0%; to ciprofloxacin, 51.7%; to penicillin, 35.1%; and to streptomycin, 27.6%. We did not detect any isolate resistant to vancomycin. We genotyped 44 available isolates, 32 from study patients and 12 controls. Twenty-nine isolates were distributed in 11 PFGE patterns, the remaining 15 isolates had distinct and unique PFGE patterns. Some isolates with related PFGE pattern were HLGR and others

non-HLGR, this may have result from transference of HLGR resistance plasmidial between isolates. Our results suggest that *E. faecalis* BSI are associated with high mortality and are frequently caused by HLGR. Hospital infection control measures, including active surveillance and judicious use of antibiotics, should be considered to reduce the spread of resistant *E. faecalis* infections in healthcare settings.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Introdução geral

Até o início da década de oitenta, os enterococos eram bactérias pouco importantes pela sua ocorrência infrequente como agente infeccioso em humanos (Kaye, 1982). Entretanto, os enterococos adquiriram destaque no meio científico nas últimas duas décadas. Sua prevalência, principalmente em infecções hospitalares, aumentou, ocupando o terceiro lugar como agente infeccioso mais frequente dentre as bactérias Gram-positivas (Sader et al., 2006). Associado a esse aumento na prevalência, ocorreram o surgimento e a disseminação da resistência dos enterococos aos antibióticos comumente utilizados para seu tratamento, o que tornou a terapêutica dessas infecções ainda mais difícil (Huycke, 1998; Low, 2001). Nesse contexto, observou-se também alta taxa de letalidade entre pacientes com infecções enterocócicas (Graninger e Ragette, 1992; Vergis et al., 2001; DiazGranados et al., 2005). Esses são alguns dos motivos pelos quais torna-se importante conhecer a epidemiologia das infecções por enterococos num dado hospital e o seu contexto no mundo.

1.2- Microbiologia clínica geral

Os enterococos são organismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, ovóides, que crescem isolados, em pares ou cadeias curtas, e são indistinguíveis de outros estreptococos clássicos pela coloração de Gram (Murray, 1990; Moellering, 1992). Em 1906, por apresentarem características morfológicas e bioquímicas semelhantes aos estreptococos, foram denominados *Streptococcus faecalis* por Andrewes e Holder¹ (1906). Em 1933, foram classificados como *Streptococcus* do grupo D pelo sistema de classificação de Lancefield. Schleifer e Kilpper-Balz (1984), ao estudarem o DNA dos enterococos, demonstraram que eles possuíam propriedades biológicas que os distinguiam dos outros estreptococos do grupo D e, por esse motivo, passaram a ser incluídos no gênero *Enterococcus*.

¹ Andrewes FW, Horder TJ. apud Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microb Reviews 1990;3,1:46-65.

Os enterococos, como os estreptococos, não possuem enzimas citocromiais e são bactérias negativas para catalase, embora algumas cepas possam produzir pseudocatalase. As propriedades intrínsecas dos enterococos permitem a identificação do gênero *Enterococcus*. O enterococo hidrolisa esculina e 90% dos isolados reagem contra anti-soro de estreptococo do grupo D. Também é capaz de crescer em meios contendo NaCl a 6,5%, em temperaturas entre 10 e 45 °C, e sobreviver a 60 °C por 30 minutos (Bosley et al., 1983). Os enterococos apresentam reação positiva para pirrolidoniil arilamidase (PYR) e leucina aminopeptidase (LAP). Estes dois últimos são testes disponíveis comercialmente em forma de disco. São testes rápidos, cujo resultado é obtido em poucos minutos (Palavecino, 2001). Outras bactérias Gram-positivas e catalase negativas podem causar, ocasionalmente, infecção em humanos e serem confundidas com enterococos porque crescem em meio NaCl 6,5% e em meio bile esculina, além de possuírem uma morfologia muito similar aos enterococos. Entre essas estão as bactérias dos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Aerococcus* (Palavecino, 2001).

As principais espécies do gênero *Enterococcus* são *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus* e *E. sulfureus* (Teixeira e Facklam, 2003). A identificação das espécies de enterococos através dos testes bioquímicos convencionais foi atualizada por Facklam et al. em 1999. Essa classificação separa as espécies em cinco grupos, baseando-se na formação de ácidos em presença de alguns substratos como manitol e sorbose e na hidrólise da arginina.

A identificação das espécies de enterococos também pode ser feita através de sistemas automatizados de diagnósticos, capazes de identificar a maioria das espécies, constituindo uma boa alternativa para laboratórios com um alto volume de amostras e capazes de absorver o custo desses sistemas. O sistema automatizado Vitek[®] (bioMérieux Hazelwood, Estados Unidos), desenvolvido em 1979, permite a identificação dessas bactérias em menos de 24 horas. Embora esse sistema identifique corretamente o *E. faecalis*, pode apresentar erros na identificação de *E. faecium* e outras espécies de enterococos pela similaridade fenotípica e pela falta de testes como motilidade e pigmento nesses sistemas. O sistema automatizado Vitek 2[®] (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França)

permite a rápida identificação, entre 4 a 15 horas, das espécies de *Enterococcus* e apresenta boa precisão (Garcia-Garrote et al., 2000).

Existem diferentes métodos para avaliar a resistência dos enterococos aos antimicrobianos. Esses métodos incluem teste de difusão em disco, microdiluição, diluição em ágar, epsilometria (Etest[®]) e sistemas automatizados como MicroScan Rapid[®] (Baxter, Sacramento, Califórnia, Estados Unidos) e Vitek GPS-TA[®] (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França). Garcia-Garrote et al. (2000) descreveram a capacidade do sistema Vitek GPS-TA[®] em realizar teste de suscetibilidade antimicrobiana para enterococos.

Os enterococos isolados de amostras clínicas devem ser rotineiramente avaliados quanto à suscetibilidade antimicrobiana para ampicilina, penicilina, quinolonas, vancomicina e aminoglicosídeos. Existem antimicrobianos aos quais os enterococos são intrinsicamente resistentes, como cefalosporinas, clindamicina. Esses agentes não devem ser avaliados nos testes de suscetibilidade porque podem apresentar suscetibilidade *in vitro* que não corresponde a suscetibilidade *in vivo* (Palavecino, 2001). Em relação aos aminoglicosídeos, os enterococos possuem resistência intrínseca de baixo nível e não devem ser testados em baixa concentração. Para a avaliação da resistência a aminoglicosídeos, testagem de gentamicina e estreptomicina são suficientes. Gentamicina é um bom preditor de suscetibilidade a outros aminoglicosídeos, como tobramicina, amicacina e canamicina e, portanto, esses não precisam ser rotineiramente testados.

Alto nível de resistência à gentamicina (do inglês, HLGR) é definida pelo Comitê Nacional de Práticas de Laboratórios dos EUA, “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), como concentrações inibitórias mínimas (CIMs) superiores a 500 µg/mL. A enzima que confere HLGR também confere a outros aminoglicosídeos, exceto estreptomicina (NCCLS, 1993; Murray et al., 1999). Já que resistência à gentamicina e à estreptomicina são devidas a mecanismos distintos, é importante realizar teste de suscetibilidade para cada um desses agentes (Chow, 2000; Palavecino, 2001). O NCCLS define como alto nível de resistência a estreptomicina CIMs superiores a 2.000 µg/mL (NCCLS, 1993).

A correta identificação das espécies de enterococos e a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos servem de base para o correto tratamento de infecções enterocócicas e implementação de medidas de controle de infecção hospitalar. Como enterococos possuem resistência a diversos antimicrobianos, essa conduta permite otimizar a atenção a cada paciente e auxilia na prevenção de emergência de resistência, seleção de cepas resistentes e transmissão de infecção hospitalar.

1.3- Sítios de infecção

Os enterococos são agentes etiológicos frequentes de infecção no trato urinário, intra-abdominal e pélvica, corrente sangüínea e sítio cirúrgico, além de casos de endocardite infecciosa e sepse neonatal (Vemuri e Zervos, 1993).

As infecções do trato urinário são as mais frequentes e a maioria é de origem hospitalar e estão frequentemente associadas a anormalidades estruturais ou fruto de instrumentação do trato urinário, como sondagem vesical (Moellering, 1992; Vemuri e Zervos, 1993). A letalidade nesses casos, na ausência de infecção da corrente sangüínea (ICS), é baixa (Vemuri e Zervos, 1993).

A etiologia das infecções intra-abdominais e pélvicas frequentemente envolve uma flora mista composta por bactérias facultativas e anaeróbias comumente encontradas no trato gastrointestinal e o enterococo é parte desta flora mista. Nesse contexto é difícil avaliar o papel patogênico dos enterococos e a distinção entre colonização e infecção (Moellering, 1992). Enterococos são isolados em aproximadamente 25% das infecções pélvicas e intra-abdominais (Vemuri e Zervos, 1993). Adicionalmente, podem causar abscessos intra-abdominais e ICS como complicação de endometrite ou salpingite aguda.

A corrente sangüínea é o terceiro sítio mais frequente de infecção por enterococos (Low et al., 2001). Portas de entrada para ICS incluem o trato urinário, cateter intravenoso e intra-arterial, infecções intra-abdominais ou pélvicas e feridas de pele, especialmente queimaduras, úlceras de decúbito e de pé diabético (Graninger e Ragette, 1992). Muitas vezes, o foco de infecção não pode ser identificado e, provavelmente, a ICS é resultado de translocação intestinal, acometendo pacientes com co-morbidades graves

(Maki e Agger, 1988; Murray, 1990; Noskin et al., 1991). Embora ICS enterocócica possa ser associada a choque séptico ou coagulação intravascular disseminada, estas complicações são raras e, quando ocorrem, estão associadas a ICS polimicrobianas com presença de bacilos Gram-negativos (Maki e Agger, 1988). Infecções metastáticas também são raras. A taxa de mortalidade em ICS por enterococo é alta, variando entre 30% a 68%, mas a contribuição exata de infecção enterocócica para o óbito é difícil de ser avaliada ou medida (Antalek et al., 1995; Hoge et al., 1991).

Muitos casos de ICS enterocócica não estão associados com endocardite, ocorrendo na frequência de um caso para 50 episódios de ICS (Moellering, 2000). Em dois estudos, nos quais revisaram-se todas as culturas de sangue positivas para enterococo, apenas dois (1,7%) de 114 pacientes e 2 (2,5%) de 79 apresentavam endocardite (Wells e von Gravenitz, 1980; Garrison et al., 1982). Por outro lado, o enterococo é a terceira causa mais frequente de endocardite infecciosa, superado apenas por *Saphylococcus aureus* e *Streptococcus viridans*, sendo responsável por aproximadamente 5% a 15% das endocardites bacterianas (Low et al., 2001; Murray, 1990). As portas de entrada incluem tratos gênito-urinário e biliar (Megran, 1992).

Os enterococos são responsáveis por aproximadamente 13% das sepses neonatais com diagnóstico microbiológico confirmado (Vemuri e Zervos, 1993). A ocorrência de meningite neonatal associada aos casos de sepse enterocócica em recém-nascidos é alta (Vemuri e Zervos, 1993).

Infecções enterocócicas ocorrem com menor frequência no sistema nervoso central e raramente causam infecção do trato respiratório, ossos ou partes moles (Murray, 1990). Meningite enterocócica é rara e ocorre em neonatos e pacientes com complicações de procedimentos neurocirúrgicos (Moellering, 1992).

1.4- Virulência e patogenicidade

Os fatores que contribuem para a capacidade de causar infecção do enterococo em humanos são pouco conhecidos (Creti et al., 2004). Em geral, os enterococos não possuem a mesma virulência de organismos como *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*

(Moellering, 1992). Para causar infecção, os enterococos precisam, além de colonizar tecido do hospedeiro, resistir aos mecanismos de defesa não específicos e imunológicos e produzir mudanças patológicas. Possíveis fatores de virulência dos enterococos incluem a capacidade de produzir proteínas de agregação e citolisinas como hemolisina e gelatinase, invadir tecidos e possuir resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (Creti et al., 2004; Mundy et al., 2000; Vergis et al., 2002).

Os enterococos podem aderir às células epiteliais do trato intestinal e urinário e células cardíacas por meio de adesinas presentes na superfície bacteriana (Johnson, 1994). Alguns estudos sugerem que substâncias de agregação, produzidas por certas cepas de enterococos, são responsáveis por mediar a adesão destes organismos em células tubulares renais e podem ter um papel na patogênese de infecções enterocócicas no trato urinário (Creti et al., 2004; Kreft et al., 1992). Durante infecção do trato urinário experimental, a proteína de superfície enterocócica chamada Esp, presente na parede celular dos *E. faecalis*, aumentou a persistência dos enterococos em bexiga urinária (Shankar et al., 2001; Vergis et al., 2002).

As principais citolisinas produzidas pelos enterococos são hemolisina e gelatinase. Hemolisina é uma proteína citolítica, capaz de promover a lise de bactérias, eritrócitos de humanos, cavalos e coelhos (Vergis et al., 2002). Em modelos de infecções em animais e, também, em infecções em humanos, cepas de *E. faecalis* produtoras de hemolisina mostraram-se mais virulentas e associadas a infecções mais graves (Ike et al., 1984; Ike et al., 1987; Johnson, 1994). Chow et al. (1993), utilizando modelos animais, demonstraram que endocardites causadas por cepas de *E. faecalis* produtoras de hemolisina e substâncias de agregação estão associadas com aumento da letalidade. Gelatinase é uma proteína capaz de hidrolizar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos (Vergis et al., 2002). Coque et al. (1995) demonstraram que cepas produtoras de gelatinase são mais virulentas do que as não produtoras.

Os enterococos são capazes de atingir a corrente sanguínea através de translocação bacteriana (Wells et al., 1988; Wells et al., 1990). Os mecanismos envolvidos nesse processo não são completamente conhecidos. Provavelmente os enterococos são fagocitados por macrófagos teciduais ou células epiteliais intestinais e seu transporte é feito

através da parede intestinal pelo sistema linfático (Wells et al., 1988). Falhas na destruição dos organismos fagocitados podem levar à disseminação sistêmica (Wells et al., 1990).

1.5- Epidemiologia molecular

A tipagem molecular é um método de análise do material genético cromossomal ou extracromossomal dos microorganismos que permite a classificação desses de acordo com as suas características genotípicas (Arbeit, 1999). É importante lembrar que isolado representa uma cultura pura, obtida a partir de um único microorganismo. Cepa, por sua vez, corresponde a um grupo de isolados de uma mesma espécie com antecedente comum, obtidos a partir de reprodução assexuada e que, portanto, compartilham características fenotípicas e genotípicas (Arbeit, 1999).

A tipagem molecular de microorganismos pode auxiliar na investigação de surtos de infecção hospitalar, na determinação da relação filogenética entre organismos e no estudo da dinâmica das infecções bacterianas na prática clínica (Bingen, 1994; Grimont e Grimont, 1986). Em muitos casos, a tipagem molecular permite uma melhor compreensão dos mecanismos de infecção de determinados microorganismos ao auxiliar na identificação de infecção cruzada entre pacientes (Macedo de Oliveira, 2001).

Diferentes métodos moleculares foram utilizados no estudo da epidemiologia e diversidade de isolados enterocócicos, incluindo eletroforese em gel com campo pulsátil (do inglês, PFGE) e reação em cadeia da polimerase (do inglês, PCR). A PFGE é considerada o método de escolha para tipagem de enterococos por possuir alta reprodutibilidade e bom poder discriminatório para classificar isolados em cepas. No entanto, é um método caro e trabalhoso (Tenover et al., 1995; Tenover et al., 1997).

1.6- Epidemiologia ambiental e hospitalar

O enterococo pode ser encontrado em solo, água e alimentos. O seu principal reservatório humano é o trato gastrointestinal, no entanto ele também pode ser encontrado esporadicamente em cavidade oral, vesícula biliar, uretra e vagina (Murray, 1990;

Moellering, 1992). Em 1899, o termo *Enterococcus* spp. foi proposto por Thiercelin² (1899) em um artigo publicado na França, com a proposta de enfatizar a origem intestinal desse microorganismo. As fezes de indivíduos adultos saudáveis contêm altas concentrações de *E. faecalis*, >10⁶ unidades formadoras de colônia (UFC)/gr. O *E. faecium* é encontrado em concentrações menores nas fezes e está presente em aproximadamente 25% dos adultos saudáveis (Ruoff et al., 1990). Até o início da década de 90, o *E. faecalis* era responsável por aproximadamente 80 a 90% das infecções enterocócicas e o *E. faecium* por 5 a 10% (Ruoff et al., 1990). Nos últimos anos, porém, a prevalência do *E. faecium* aumentou, atingindo aproximadamente 20% das infecções enterocócicas, especialmente em locais onde há alta prevalência de resistência à vancomicina (Jones et al., 1997; Low et al., 2001). *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são responsáveis por menos de 5% das infecções enterocócicas em humanos (Gordon et al., 1992; Jones et al., 1997; Simonsen et al., 2003). Outras espécies enterocócicas são raramente encontradas e isoladas quase exclusivamente de fontes da agricultura ou veterinária (Low et al., 2001).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões de pacientes por ano adquirem infecção hospitalar; aproximadamente 350.000 (18%) destas infecções envolvem a corrente sanguínea e 90.000 são fatais (Weinstein et al., 1997; Edmond et al., 1999; Diekema et al., 2003). No Brasil, os dados sobre a magnitude das infecções hospitalares são escassos. Entre 1991 e 1995, a taxa de infecção hospitalar global encontrada no Brasil por Starling et al. (1997) foi de 5%.

Entre os agentes etiológicos causadores de infecção hospitalar, os enterococos são patógenos frequentes (Peset et al., 2000; Low et al., 2001). No início da década de 90, dados do programa governamental americano para vigilância de infecções hospitalares, “National Nosocomial Infectious Surveillance System” (NNIS) identificaram o enterococo como a segunda mais frequente causa de infecção hospitalar e responsável por 12% das infecções hospitalares nos Estados Unidos (Schaberg, 1991). Ainda de acordo com esses dados, as infecções enterocócicas hospitalares aumentaram 12% entre 1986 e 1989 (Schaberg, 1991). Em 1996, dados do Programa de Vigilância e Controle de Patógenos de

² Thiercelin ME. apud Murray BE. The life and time of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 1990;3:46-65.

Importância Epidemiológica, “Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance” (SCOPE), demonstraram que os enterococos eram responsáveis por 11,7% de todos os patógenos isolados em sangue, com um aumento na incidência de 3% em relação a 1993 (Jones et al., 1997).

Atualmente, o enterococo é o terceiro agente mais freqüente associado com ICS em pacientes hospitalizados, responsável por 10% das ICSs hospitalares (Karlowsky et al., 2004; Wisplinghoff et al., 2004). Em infecções urinárias hospitalares, os enterococos são a segunda etiologia mais comum após *Escherichia coli* (Kania et al., 2000).

No Brasil, ICSs por enterococos são menos freqüentes. De acordo com Dados da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) os enterococos representam a quinta etiologia mais freqüente em ICS hospitalares e, entre 2006 e 2007, foram responsáveis por 5% das ICS hospitalares. Entre as bactérias Gram-positivas são a segunda etiologia mais freqüente.

Os fatores de risco para infecção hospitalar por enterococos, descritos por estudos nas décadas de 80 e 90, relacionam-se a fatores do hospedeiro, do ambiente hospitalar e características próprias do enterococo (Murray, 1990). Fatores do hospedeiro incluem maior gravidade do paciente, tempo de hospitalização prolongado, cirurgias extensas em cavidade abdominal, utilização de cateteres venosos ou urinários, utilização de dreno e, por fim, terapia antimicrobiana prolongada (Chenoweth e Schaberg, 1990; Johnson, 1994; Moellering, 1992).

O ambiente hospitalar favorece o desenvolvimento de infecção enterocócica através da transmissão cruzada e freqüente uso de antibióticos (Zervos et al., 1986; Murray, 1990). Evidências corroboram a disseminação exógena de infecções enterocócicas (Zervos et al., 1987a). Estudos demonstraram a transmissão de enterococos de paciente-a-paciente através de profissionais da área da saúde em surtos hospitalares de *E. faecalis* em unidades de tratamento intensivo (UTI) (Zervos et al., 1987a; Murray et al., 1991).

Enterococos resistentes podem colonizar o trato gastrointestinal de pacientes e profissionais da saúde por períodos que variam de semanas a anos, o que, associado com a sua persistência no ambiente hospitalar após procedimentos de limpeza, aumenta o risco de

sua disseminação e mantém o reservatório desta bactéria (Moellering, 1992). Handweger et al. (1993) descreveram um surto de enterococos resistentes à gentamicina, penicilina e vancomicina. A análise dos fragmentos de DNA genômico demonstrou perfis similares, indicando a disseminação da mesma cepa através de profissionais da saúde. Em 1998, um estudo demonstrou que 29% dos profissionais da saúde, após removerem luvas, ainda apresentavam enterococo resistente a vancomicina (do inglês ‘enterococos vancomycin resistant’, VRE) em suas mãos (Badri et al., 1998).

Rhinehart et al. (1990) demonstraram a rápida disseminação de cepas de *E. faecalis* resistentes a aminoglicosídeos e produtoras de beta-lactamase em uma enfermaria de cirurgia pediátrica através das mãos de uma enfermeira. Após medidas para controlar o surto, como busca ativa de casos, utilização de barreiras de proteção e reforço das precauções universais, ocorreu queda na incidência de colonização e infecção de pacientes. Para completo controle do surto, foi necessário a transferência da enfermeira para outro setor.

Na Suécia, demonstrou-se que *E. faecalis* HLGR isolados em sangue representavam um surto de isolados geneticamente relacionados, indicando a disseminação de uma mesma cepa entre pacientes (Saeedi et al., 2004). Em um hospital na Holanda, a incidência de isolados HLGR em sangue aumentou de 14% em 1991 para 31% em 1997. Durante esse período foram identificados 19 perfis de PFGE diferentes, mas dois perfis predominaram com aumento na sua incidência de 10% para 15% entre 1991 e 1997, indicando possível transmissão paciente-a-paciente (van Den Braak et al., 1999). No Brasil, Moretti et al. (2004) demonstraram a disseminação de VRE entre dois hospitais distantes 100 quilômetros um do outro.

Nos últimos anos, enterococos resistentes passaram a ser mais freqüentemente encontrados na flora endógena de pacientes hospitalizados, compondo parte da flora detectada nas diversas mucosas, o que possibilita infecção e transmissão cruzada por organismos resistentes (Lerma et al., 2003; Vemuri e Zervos, 1993). Com elevada freqüência, a colonização entérica por enterococo resistente precede infecção (Wells et al., 1995). O trato intestinal é o sítio em que, mais comumente, ocorre persistente colonização por cepas resistentes, especialmente entre aqueles com freqüentes internações

hospitalares, podendo ocorrer subsequente contaminação de pele e cateter por cepas resistentes nesses pacientes (Beezhold et al., 1997; Bonten et al., 1998; Mundy et al., 2000).

O uso de antibióticos de amplo espectro no ambiente hospitalar elimina ou suprime bactérias suscetíveis, promovendo, assim, vantagens seletivas para organismos resistentes como os enterococos (Mundy, 2000). A pressão seletiva, provocada pelo uso de cefalosporinas de amplo espectro e outros antimicrobianos com pouca atividade contra enterococo, permite ao enterococo prevalecer entre bactérias que colonizam o trato gastrointestinal de pacientes submetidos a antibioticoterapia prolongada (Berk et al., 1983; Coudron et al., 1984; Hoffman e Moellering, 1987). Morrison e Wenzel (1986) demonstraram, em um hospital no estado de Virgínia nos Estados Unidos, um aumento de 2,5 vezes na incidência de infecções enterocócicas do trato urinário em um período de 10 anos. Provalmente essa elevação deveu-se ao aumento na utilização de cefalosporinas nesse hospital, de 64.000 para 114.000 g por ano. Em outros quatro estudos, 42% a 78% dos pacientes com ICS enterocócica haviam recebido antimicrobianos previamente ao início da infecção enterocócica (Barral et al., 1985; Gullberg et al., 1989; Malone et al., 1986; Maki e Agger, 1988).

1.7- Tratamento

Antimicrobianos com ação sobre os enterococos, como ampicilina e vancomicina, quando utilizados isoladamente possuem somente atividade bacteriostática (Landman e Quale, 1997). Atividade bactericida contra enterococo é obtida através da associação sinérgica de um aminoglicosídeo, gentamicina ou estreptomicina, com um antimicrobiano ativo na síntese da parede bacteriana, glicopeptídeos ou penicilinas (Moellering, 1991; Moellering, 2000). Vale lembrar que sinergismo é uma ação antibacteriana maior do que aquela alcançada por somente um antibiótico. Para enterococo, atividade sinérgica é definida como um aumento $\geq 2 \log^{10}$ na morte bacteriana versus o efeito de um agente com ação somente na parede celular (Murray, 1990).

Para infecções de baixa gravidade, como infecções do trato urinário e partes moles, monoterapia antimicrobiana é suficiente, especialmente na ausência de ICS (Vemuri e Zervos, 1993; Landman e Quale, 1997). Terapia combinada é recomenda para

pacientes com infecção grave, como meningite ou endocardite, pela necessidade de atividade bactericida no sítio de infecção que não é alcançada por nenhum antibiótico isoladamente (Graham e Gould, 2002). Em relação a ICS na ausência de endocardite, não há consenso na literatura quanto à terapêutica com monoterapia ou terapia combinada. Na ausência de estudos controlados, alguns autores recomendam o uso de monoterapia enquanto outros a utilização de terapia combinada, especialmente quando ICS ocorre em pacientes graves (Vemuri e Zervos, 1993; Maki e Agger, 1988; Landman e Quale, 1997).

Quando associados a um agente com atividade na parede celular do enterococo, os aminoglicosídeos penetram com maior facilidade e atuam com maior eficácia na destruição bacteriana (Zervos et al., 1986; Antalek et al., 1995). Cepas com alto nível de resistência a um determinado aminoglicosídeo estão associadas à perda do sinergismo bactericida entre penicilina e este aminoglicosídeo, e a utilização dessa combinação não apresenta benefícios e outra opção deve ser buscada (Baddour et al., 2005). Nesse contexto, o manejo das infecções por enterococos com alto nível de resistência a aminoglicosídeo precisa ser modificado e o prognóstico dessas infecções pode ser mais grave (Moellering, 1999; Snyderman et al., 2000).

O surgimento e a disseminação de enterococos VRE observada nas últimas décadas tornaram a terapêutica dessas infecções um desafio ainda maior, especialmente porque infecção por VRE está associada com letalidade maior quando comparado com infecções por enterococos vancomicina sensível (Edmond et al., 1996; Linden et al., 1996).

1.8- Suscetibilidade antimicrobiana e implicações clínicas

A resistência antimicrobiana pode ser intrínseca ou adquirida (Murray, 1998). Resistência intrínseca é uma característica da espécie e está presente em todos ou na maioria dos isolados de uma dada espécie. O gene para resistência intrínseca reside no cromossomo. Resistência adquirida resulta de mutação do ácido desoxirribonucleico (DNA) cromossômico ou da aquisição de novo DNA, através de plasmídeos, bacteriófagos, transpósons ou mesmo inserção no DNA cromossomal. Vale lembrar que os transpósons

são seqüências de DNA móveis que podem se auto-replicar em um determinado genoma e os bacteriófagos caracterizam-se pela transferência de material genético entre duas bactérias feita por vírus.

Os enterococos são intrinsicamente resistentes a alguns agentes antimicrobianos como cefalosporinas, penicilinas semi-sintéticas (oxacilina), aminoglicosídeos (baixo nível), clindamicina e trimetropin/sulfametoxazol, utilizados para tratamento de infecções por outros organismos Gram-positivos (Leclercq e Courvalin, 1997; Low et al., 2001). A resistência a aminoglicosídeos em baixo nível está relacionada ao transporte ativo ineficiente destes através da membrana citoplasmática da bactéria. A resistência intrínseca às penicilinas, por sua vez, é devido à diminuída afinidade das proteínas ligadoras de penicilina (do inglês, PBPs) (Moellering, 1991). Isto permite a síntese da parede celular bacteriana mesmo na presença de antibióticos beta-lactâmicos (Moellering, 1992).

Além da resistência intrínseca, enterococos são capazes de adquirir resistência antimicrobiana através de mecanismos eficientes de transferência de genes (Balas et al., 1997; Huycke et al. 1998; Low et al., 2001). Enterococos trocam plasmídeos via conjugação e genes de resistência via transpóson (Murray, 1998). Mutações isoladas também podem ocorrer (Moellering, 1992). Em alguns casos, bacteriófagos transferem genes de resistência entre enterococos (Moellering, 1992). A primeira descrição de resistência adquirida entre enterococos foi feita por Raycroft e Zimmerman (1964). Eles descreveram resistência a cloranfenicol através da transferência conjugada de genes de resistência de uma cepa de *E. faecalis* para outra. Quinze anos depois, 20% a 42% dos enterococos eram resistentes a cloranfenicol (Atkinson e Lorian, 1984; Acar e Buu-Hoi, 1988).

Resistência adquirida pelos enterococos às penicilinas, aos aminoglicosídeos e à vancomicina são atualmente motivo de grande preocupação entre pesquisadores, microbiologistas e médicos clínicos porque dificulta o tratamento das infecções enterocócicas. O mecanismo de resistência adquirida a penicilinas é através da produção de beta-lactamase (Moellering, 1991). Os genes codificadores de beta-lactamase foram encontrados em plasmídeos transferíveis que, além de codificar resistência à

beta-lactâmicos, codificam para alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (Murray et al., 1991; Wells et al., 1992). Enterococos produtores de beta-lactamase hidrolisam penicilina, ampicilina, piperacilina e outras ureidopenicilinas, o que promove resistência a esses antimicrobianos (Murray et al., 1986). Os primeiros enterococos produtores de beta-lactamase foram descritos na cidade de Houston, estado do Texas nos Estados Unidos, em 1981 (Murray et al., 1986). Estudos genéticos sugeriram uma origem comum para isolados resistentes produtores de beta-lactamase geograficamente diversos (Moellering, 1991; Murray, 1990;). Enterococos produtores de beta-lactamase foram isolados em outras regiões da América do Norte e do Sul, mas permanecem pouco freqüentes (Huycke et al., 1998; Murray, et al., 1991; Patterson et al., 1988; Patterson et al., 1990).

Resistência adquirida aos aminoglicosídeos é atualmente freqüente entre os enterococos e está associada à perda do sinergismo entre agente ativo na parede celular e aminoglicosídeo (Murray, 1990). A maioria dos enterococos com alto nível de resistência a aminoglicosídeos contém plasmídeos com genes que codificam a resistência (Murray, 1998). Alto nível de resistência ao aminoglicosídeo estreptomicina pode ser ribossomal, em decorrência de mutação, ou através de modificação enzimática por adeniltransferase (Murray, 1990). Estreptomicina foi usada em terapia combinada com penicilina de 1945 a 1970 (Noskin et al., 1991). No início dos anos 70, um grande número de enterococos com alto nível de resistência a estreptomicina foi identificado em várias partes dos Estados Unidos (Moellering et al., 1971). No entanto, a combinação penicilina e gentamicina mantinha o sinergismo contra os enterococos testados em 1970 (Moellering, 1971). A terapia combinada penicilina-gentamicina passou, então, a ser amplamente utilizada para o tratamento de infecções enterocócicas graves.

Os primeiros isolados de enterococos HLGR foram descritos na França em 1979 (Horodniceanu et al., 1979) e nos Estados Unidos em 1983 (Mederski-Samoraj e Murray, 1983). Nas décadas seguintes, enterococos HLGR e com alto nível de resistência a outros aminoglicosídeos disseminaram-se pelo mundo (Gordon et al., 1992; Landry et al., 1989; Xinghua et al., 1988). A prevalência de isolados altamente resistentes a vários aminoglicosídeos varia de um lugar para outro. Nos Estados Unidos,

aproximadamente 40% dos enterococos são HLGR (Low et al., 2001). Em um estudo europeu, que incluiu 27 países, a proporção de HLGR entre isolados enterocócicos variou de 1% a 49% (Schouten et al., 1999). O HLGR é relacionado com a enzima bifuncional aminoglicosídeo acetiltransferase AAC (6')-2''-aminoglicosídeo fosfotransferase APH (2'') (Chow, 2000). Essa enzima é idêntica àquela encontrada em estafilococos resistentes à gentamicina e, também, promove alto nível de resistência à canamicina, amicacina, tobramicina e metilmicina, mas não confere alto nível de resistência à estreptomicina (Noskin et al., 1991; Leclercq e Courvalin, 1997). O gene codificador está localizado em plasmídeos ou integrado ao cromossoma e, portanto, pode ser transferido entre isolados (Woodford et al., 2003).

Em 1986, foram registrados os primeiros casos de VRE no Reino Unido e na França (Uttley et al., 1989). Desde então, um rápido aumento no número de infecções hospitalares por VRE foi relatado pelos Centros para o Controle e Prevenção de Doenças, “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), nos Estados Unidos (CDC, 1993). A partir do início da década de 90, surtos hospitalares de infecção e colonização por VRE foram relatados ao redor do mundo e têm recebido crescente atenção (CDC, 1993; McDonald et al., 1997; Depardieu et al., 2004). Em 1989, a resistência à vancomicina era encontrada em 0,3% dos enterococos em hospitais norte-americanos e em 0,4% nas UTIs. Em 1993, a resistência aumentou cerca de 20 vezes, atingindo 7,9% em enfermarias, 13,9% em UTIs e 17% em hospitais universitários em 1999 (CDC, 1993; Low et al., 2001). Em países da Europa, a prevalência de VRE é menor, inferior a 10% (Low et al., 2001).

No Brasil, o padrão de resistência dos enterococos apresenta ampla variação geográfica. Cardoso et al. (1996), na cidade do Rio de Janeiro em 1996, encontraram 15% de HLGR entre os enterococos de origem comunitária e ausência de resistência à ampicilina e à vancomicina. Já em amostras de origem hospitalar, encontraram 27% de HLGR e 8% de resistência à ampicilina. Em Campinas, São Paulo, Caraccio et al. (1995) demonstraram que 9% das amostras obtidas de diversos sítios eram resistentes à ampicilina em um hospital secundário. Em 1997, Sader et al. (1999) encontraram prevalência de 20% de resistência à penicilina G e 55% de HLGR, além de ausência de resistência à vancomicina em amostras de enterococos originadas de diferentes cidades do Brasil. Ribas

e Contijo (1998), por sua vez, encontraram 70% de HLGR e 31,7% de resistência à ampicilina em Uberlândia, Minas Gerais. Na última década enterococos com resistência à vancomicina foram identificados no Brasil. Entre 1994 e 1995, Cereda et al. (1997), ao estudarem 250 isolados de enterococos, encontraram 26,4% de HLGR e 4,8% de resistência à vancomicina. De acordo com dados Rede RM no Brasil, 46% dos *E. faecalis* isolados em sangue possuíam HLGR, 30% alto nível de resistência a estreptomicina, 9% resistência a vancomicina e 4% a ampicilina.

Considerando a alta frequência de infecções enterocócicas hospitalares e resistência aos principais agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica, é importante conhecer a epidemiologia das infecções enterocócicas, reconhecer aumento na incidência de infecções enterocócicas, identificar surto e, por fim, avaliar as taxas e os padrões de resistência. O uso da tipagem molecular, por outro lado, permite determinar o grau de parentesco entre diferentes isolados e relacioná-los em cepas. Desta forma é possível saber se os isolados têm origem comum e, assim, auxiliar na instituição de estratégias de controle. Estudos epidemiológicos e microbiológicos auxiliam na terapêutica dos pacientes pela formulação de recomendações sobre antibioticoterapia empírica. Assim, desenvolvemos este projeto para estudar a epidemiologia das ICSs hospitalares causadas por *E. faecalis* no Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp.

2- OBJETIVOS

Avaliar a epidemiologia das ICSs por *Enterococcus faecalis* no HC-Unicamp quanto a:

- Características demográficas e clínicas dos pacientes acometidos;
- Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *E. faecalis*;
- Taxa de letalidade dos casos;
- Variáveis associadas a HLGR;
- Variáveis associadas à evolução para óbito;
- Perfil genotípico dos isolados de *E. faecalis*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Local e período de estudo

Este estudo foi realizado no HC-Unicamp, Campinas, estado de São Paulo, Brasil. Trata-se de hospital universitário terciário que possui 400 leitos para atendimento clínico, cirúrgico e pediátrico. Conta com 16 enfermarias que englobam diversas especialidades médicas e 3 UTIs: clínico-cirúrgica, coronariana e pediátrica. Possui também duas unidades semi-intensivas, Emergência Clínica e Cirurgia do Trauma. O HC é referência para uma população de aproximadamente cinco milhões de habitantes. O período de estudo foi de 1º de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2003. Durante esse período ocorreram entre 14.164 a 14.841 internações por ano.

3.2- População de estudo

Identificamos os pacientes com hemocultura positiva para *E. faecalis* através da revisão do banco de dados mantidos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica do HC- Unicamp. Foram incluídos pacientes com pelo menos uma amostra de hemocultura positiva para *E. faecalis* e internados durante o período de estudo. Em casos de múltiplos episódios de ICS no mesmo paciente, somente o primeiro episódio foi avaliado.

3.3- Definições

Seguindo definições internacionais, ICS foi considerada como pelo menos uma hemocultura positiva para *E. faecalis* com ou sem sinais e sintomas associados (Garner et al., 1988). ICS hospitalar foi definida como cultura positiva de amostra colhida pelo menos 72 horas após admissão e sem evidência de infecção presente no momento da admissão. ICS de comunidade foi definida como cultura positiva de amostra colhida com menos de 72 horas ou evidência de infecção no momento da admissão. ICS polimicrobiana como aquela na qual se isolou outro organismo, além do enterococo, no mesmo frasco de hemocultura. Considerou-se como paciente pediátrico aquele com idade ≤ 14 anos.

3.4- Desenho do estudo

Este é um estudo retrospectivo descritivo. Os prontuários médicos dos pacientes admitidos no HC-Unicamp com hemocultura positiva para *E. faecalis* foram revisados, utilizando-se formulário estruturado (Anexo 1). Esse formulário continha dados de identificação, idade, sexo, especialidade responsável pela internação e, por fim, o leito, a data, o tempo e o diagnóstico de internação. Obtivemos também informações sobre presença de dispositivo e procedimentos invasivos realizados até hemocultura positiva e antibioticoterapia prévia com identificação de quais agentes foram utilizados e o tempo de uso. Informação sobre evolução no momento da alta, vivo ou óbito, também foi avaliada.

Avaliamos, como parte desse estudo, os seguintes dispositivos invasivos: tubo de ventilação mecânica, cateter venoso central (CVC), cateter vesical de demora (CVD) e dreno torácico ou abdominal. Coletamos informações sobre a utilização dos antibióticos vancomicina, aminoglicosídeos, penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas, quinolonas e metronidazol.

Informações quanto à presença de ICS monomicrobiana ou polimicrobiana, suscetibilidade do *E. faecalis* a penicilina, imipenem, ciprofloxacina, vancomicina, gentamicina e estreptomicina também foram obtidas.

Para avaliar a gravidade das co-morbidades dos pacientes, foi utilizado o índice de Charlson (Charlson et al., 1987). Esse índice infere a gravidade pela soma de pontos atribuídos a cada co-morbidade e permite relacionar a presença de co-morbidades com taxas de mortalidade (Tabela 1). A taxa de mortalidade em 1 ano para escore 0 é 12%; para escores 1 e 2 é 26%; para 3 e 4 é 52% e para ≥ 5 é 85%. Em 10 anos, para escore 0 é 8%; 1, 25%; 2, 48% e ≥ 3 , 59%.

Tabela 1- Pontuação de Charlson para co-morbidades.

Co-morbidades*	Peso atribuído a cada co-morbidade
Infarto agudo do miocárdio, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca congênita, demência, doença cerebrovascular, doença vascular periférica, úlcera péptica, doença do tecido conjuntivo, diabetes mellitus e hepatopatia leve	1
Hemiplegia, doença renal moderada ou grave, neoplasia maligna, leucemia, linfoma e diabetes com dano de órgão	2
Doença hepática moderada ou grave	3
Aids, tumor sólido metastático	6

*Cada co-morbidade presente adiciona 1, 2, 3 ou 6 pontos ao índice de Charlson para um dado paciente

Analizamos variáveis separadamente para pacientes com infecção por isolados HLGR e não HLGR e estudamos as mesmas variáveis para pacientes com evolução para óbito ou não.

3.5- Métodos laboratoriais

Estudo microbiológico

Identificou-se o gênero e a espécie através do método automatizado ‘Gram Positive Identification Card’ (bioMérieux Vitek, Marcy l’Étoile, França), de acordo com especificações do fabricante. Suscetibilidade antimicrobiana foi realizada através do ‘Gram Positive Susceptibility Card’ (bioMérieux Vitek, Marcy l’Étoile, França), também de acordo com as especificações do fabricante. Os antibióticos testados foram ampicilina, penicilina, ciprofloxacina, gentamicina, estreptomicina e vancomicina.

Estudo molecular

Realizamos a genotipagem dos isolados através da técnica de PFGE descrita no Anexo 2. Incluímos neste estudo isolados de *E. faecalis* armazenados no banco de bactérias do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas da Faculdade de

Ciências Médicas da Unicamp. Como parte da rotina do HC-Unicamp, *E. faecalis* isolados em sítios estéreis são rotineiramente armazenados no banco de bactérias.

Amostras de pacientes incluídos neste estudo fizeram parte de nossa análise molecular. Isolados obtidos de um mesmo paciente ou de paciente não internado foram utilizados como controles. Isolados estavam estocados em leite desnatado e foram reativados através de cultivo em caldo de infusão de cérebro e coração (do inglês, BHI), com incubação a 35°C e sob agitação por 24 horas. A seguir, foram semeadas em meio ágar sangue de carneiro (5%) e incubados a 35°C por 24 horas.

Das amostras reativadas, semeamos 10 unidades formadoras de colônia (UFC) em 20 mL de meio líquido BHI e as incubamos por 24 horas a 37°C sob agitação; transferimos 1mL para tubos “Eppendorf®”. Centrifugamos as amostras por 5 min a 12.000 rpm a 20°C, lavamos o sedimento por três vezes com solução salina estéril (0,85%). Desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos o sedimento em 500µl de solução Pet IV (NaCl 1 M + Tris 0,01 M, pH 7,5) (Anexo 2). A essa solução, adicionamos 500 µl de agarose 2% a solução “EC buffer” (Tris 0,006 M, pH 7,5 + NaCl 1,0 M + EDTA 0,1 M + Polioxietileno 20 cetil éter [Brij 58] a 0,5% + ácido deoxicólico a 0,2% + N-laurilsarcosina a 0,5%). Transferimos essa solução para moldes de PFGE, que foram resfriados a 4°C por 30 minutos. Os blocos solidificados foram incubados a 37°C, por 24 horas em tampão de lise “EC buffer” (Tris 0,006 M, pH 7,5 + NaCl 1,0 M + EDTA 0,1 M + Polioxietileno 20 cetil éter [Brij 58] a 0,5% + ácido deoxicólico a 0,2% + N-laurilsarcosina a 0,5%) e 200 µg de lisozima.

Transcorrido o tempo de incubação, lavamos os blocos com TE de baixa molaridade (EDTA 0,001 M, pH 7,5 + Tris 0,01 M, pH 7,5). Para a degradação protéica, incubamos os blocos a 50°C por 24 h em solução ESP (EDTA 0,625 M, pH 9,3 + N-laurilsarcosina 5% + proteinase K 20 mg/ml) e, a seguir, os lavamos com solução TE de baixa molaridade, sucessivas vezes. Os blocos separados para eletroforese foram lavados em solução “Dummy no Salt” para reposição de magnésio. Para a digestão com endonuclease de restrição, tratamos os blocos com *SmaI* (Gibco BRL) por 24 h a 30°C.

Realizamos a eletroforese em gel de agarose a 1% ultra-pura de grau cromossômico (Bio Rad Laboratories, Richmond, Califórnia, Estados Unidos) em tampão TBE 0,5X (Trisma base + ácido Bórico + EDTA 0,5 M, pH 8,0). A corrida de eletroforese foi realizada em aparato CHEF DR III System (Bio Rad Laboratories, Richmond, Califórnia, Estados Unidos). As condições de corrida foram ciclos de 5 segundos, tempo inicial, e 35 segundos, tempo final, 6 volts/cm em temperatura de 14 °C, com tempo total de 20 horas. Utilizamos marcador de peso molecular DNA Lambda concatemer (Bio Rad Laboratories, Richmond, Califórnia, Estados Unidos). O gel foi banhado em brometo de etídio a 0,5 µg/mL por 30 minutos e fotografado sob luz ultravioleta.

A análise das relações de similaridade dos perfis genotípicos obtidos por PFGE foi feita através do sistema de imagens Bio-Capt MEW (versão 99, M&S Instruments Trading Inc, Vilbert-Loumart, França). O coeficiente de Dice foi utilizado na análise do dendrograma gerado pelos perfis moleculares, considerando 95% de confiança (Biogene[®] software, Vilbert-Loumart, França).

Isolados, demonstrando diferenças entre uma e três bandas e uma similaridade $\geq 85\%$, foram considerados representantes do mesmo perfil de PFGE (Zarrilli et al., 2005). Isolados com perfil de PFGE diferindo em mais de três bandas e com similaridade $< 85\%$ no dendrograma foram considerados representantes de diferentes perfis de PFGE.

Cada isolado genotipado foi identificado com um número e aqueles considerados representantes do mesmo perfil de PFGE uma mesma letra do alfabeto arábico.

3.6- Análise estatística

Analizamos o perfil dos casos, segundo as variáveis em estudo, através de análises de frequência para variáveis categóricas. Para variáveis contínuas, foi utilizada estatística descritiva, incluindo medidas de posição e dispersão, média, desvio-padrão, mediana e valores mínimo e máximo.

Para analisar a relação entre variáveis associadas à infecção por *E. faecalis* HLGR versus não HLGR, realizamos análise univariada utilizando regressão logística modelo logito. Variáveis com valor $p < 0,2$ na análise univariada foram incluídas na análise de regressão logística multivariada modelo stepwise. O mesmo foi feito para análise de variáveis associadas a óbito.

Utilizamos o método de estimação de Kaplan-Meier para analisar a sobrevida dos pacientes com infecção por *E. faecalis* HLGR e não HLGR. Realizamos a comparação das curvas de sobrevida através do teste Log-Rank, considerando o intervalo entre a data da hemocultura positiva e a data de óbito ou alta hospitalar.

Através do modelo de regressão linear, analisamos a tendência da densidade de incidência de ICS por *E. faecalis* por mil pacientes/dia, no HC-Unicamp, ao longo dos 5 anos do estudo. Calculamos a densidade anual de incidência de ICS por *E. faecalis* por 1.000 pacientes/dias, dividindo o número de pacientes com ICS pelo número de pacientes/dias. O limite endêmico foi calculado adicionando-se e subtraindo-se o desvio-padrão multiplicado por 1,96 da média das densidades anuais de incidência por 1.000 pacientes/dias das ICSs por *E. faecalis*. A análise de tendência da resistência antimicrobiana dos *E. faecalis*, entre os anos de 1999 e 2003, foi realizada através do teste de tendência de Cochran-Armitage. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0.05$).

4- RESULTADOS

4.1- Característica dos pacientes

Durante o período de estudo, identificamos 164 pacientes com hemocultura positiva para *Enterococcus faecalis*. Onze pacientes não foram incluídos porque não estavam internados no momento em que a hemocultura foi colhida, outros oito pacientes também não foram incluídos porque os prontuários não foram localizados. No total, 145 foram incluídos no estudo.

A mediana de idade dos pacientes foi de 45 anos (intervalo de 1 dia a 81 anos), com maior frequência entre 14 e 64 anos. A Tabela 2 descreve os dados demográficos e clínicos da população de estudo. Endocardite por *E. faecalis* foi diagnosticada em dois pacientes, segundo a avaliação do médico assistente durante a internação.

As co-morbidades mais frequentes foram neoplasia e hipertensão arterial, seguida por doença renal e diabetes (Tabela 2). Em relação à gravidade das co-morbidades, a mediana da pontuação de Charlson foi de 2 (intervalo de 0 a 9). Em 16 pacientes, 15 dos quais pediátricos, não foi possível determinar a pontuação de Charlson porque apresentavam co-morbidades que não puderam ser classificadas nesse sistema. Essa classificação foi validada em uma população adulta e co-morbidades presentes mais frequentemente em populações pediátricas não foram avaliadas por essa classificação.

Dos 145 pacientes, 128 (88,3%) apresentavam pelo menos uma co-morbidade; 49 (34%) apresentaram mais de uma co-morbidade (Tabela 2). Dezesete (11,7%) pacientes não apresentavam co-morbidade no momento da internação. No entanto, os diagnósticos de internação eram frequentemente graves: tétano, desnutrição grave, politrauma, ferimento por arma branca, queimadura, insuficiência renal aguda associada à coagulação intravascular disseminada, síndrome hemolítico-urêmica, púrpura trombocitopênica idiopática, empiema associado a insuficiência renal aguda, esofagite cáustica, bloqueio átrio-ventricular, abscesso renal e tumor de ovário.

Tabela 2- Características demográficas e clínicas dos 145 pacientes (n) com infecção de corrente sanguínea (ICS) por *Enterococcus faecalis* no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp), janeiro de 1999 a dezembro de 2003.

Característica	n (%)
Sexo	
Masculino	78 (53,8)
Feminino	67 (46,2)
Idade (anos)	
<1	18 (12,4)
1–14	7 (4,8)
>14–64	89 (61,4)
≥65	31 (21,4)
Co-morbidades	
Neoplasia	50 (34,4)
Sólida	25 (17,2)
Hematológica	25 (17,2)
Hipertensão arterial sistêmica	28 (19,3)
Doença renal	21 (14,4)
Diabetes mellitus	18 (12,4)
Doença neurológica	14 (9,6)
Insuficiência cardíaca	13 (9,0)
Doença hepática	9 (6,2)
Doença pulmonar crônica	7 (4,8)
Sida	5 (3,4)
Úlcera gástrica	4 (2,8)
Doença vascular periférica	4 (2,8)
Infarto do miocárdio	3 (2,1)
Outras*	16 (11,3)
Pontuação de Charlson	
Mediana (intervalo)	2 (0–9)
Número de co-morbidades	
0	17 (11,7)
1	79 (54,5)
2	25 (17,2)
3	21 (14,5)
4	3 (2,1)

* Descritas no anexo 3

A ICS foi precedida pelo uso de dispositivo invasivo ou realização de cirurgia em 109 (75,2%) dos 145 pacientes (Tabela 3). CVC estava presente em 97 (67%) pacientes, CVD em 82 (56,6%) e ventilação mecânica em 49 (33,8%). Quarenta e sete (32,2%) pacientes foram submetidos a cirurgia (Tabela 3). Em relação ao uso de antimicrobianos, 89 (61,4%) dos 145 pacientes receberam antibioticoterapia durante a internação antes da primeira amostra de hemocultura positiva para *E. faecalis*. Os antibióticos mais utilizados foram cefalosporinas, metronidazol e quinolonas (Tabela 3).

Tabela 3- Procedimentos realizados, dispositivos presentes e uso de antimicrobianos em pacientes (n) com ICS por *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Procedimentos e terapia antimicrobiana	n (%)
Procedimento/dispositivo	109 (75,2)
Catéter venoso central (CVC)	97 (67,0)
Catéter vesical de demora (CVD)	82 (56,6)
Ventilação mecânica	49 (33,8)
Dreno torácico ou abdominal	22 (15,2)
Cirurgia	47 (32,2)
Terapia antibiótica prévia	89 (61,4)
Cefalosporinas	68 (47,0)
Metronidazol	33 (23,0)
Quinolonas	29 (20,0)
Aminoglicosídeos	21 (14,5)
Penicilinas	18 (12,4)
Carbapenêmicos	13 (9,0)
Vancomicina	13 (9,0)

A mediana entre a internação e a coleta de hemocultura com resultado positivo foi de 13 dias, variando do momento da internação até 110 dias. A ICS foi considerada de origem hospitalar em 115 (79,3%) dos 145 pacientes.

Em 70 (48,3%) dos 145 casos, outros microorganismos, além do *E. faecalis*, foram isolados na mesma amostra de hemocultura. Os agentes mais frequentemente isolados foram *Acinetobacter baumannii*, isolado em 14 episódios de ICS polimicrobiana, *Staphylococcus aureus* em 12, *Staphylococcus epidermidis* em 12, *Pseudomonas aeruginosa* em 8, *Enterobacter cloacae* em 7 e *Escherichia coli* em 5. Vinte e seis (17,9%)

dos 145 pacientes apresentavam outro sítio de infecção e outros quatro pacientes apresentaram dois sítios de infecção além de corrente sanguínea. Os sítios mais frequentes foram CVC em 11 (36,7%) de 30 pacientes; urinário em 8 (26,7%); abdominal em 8 (26,7%); partes moles em 2 (1,4%) e pulmonar em 1 (0,7%).

4.2- Comparação entre os grupos de pacientes com ICS por *E. faecalis* com HLGR e sem HLGR

Entre os 145 pacientes com ICS por *E. faecalis*, 66 (45,5%) apresentavam infecção por isolados com HLGR e 79 (54,5%) por isolados sem HLGR.

Análise univariada

A mediana de idade entre os casos com HLGR foi de 48,5 anos (intervalo de 10 a 81 anos) e dentre aqueles sem HLGR foi 38 (intervalo de 1 dia a 80 anos). Ao comparar a mediana de idade entre pacientes com HLGR e sem HLGR, houve diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p=0,008$), pacientes com infecção com HLGR possuíam idade mais avançada do que aqueles sem HLGR (Tabela 4), 24,3% possuíam idade ≥ 65 anos. Todos os pacientes menores de 1 ano de idade apresentaram ICS por *E. faecalis* sem HLGR. A cada 10 anos de idade, houve aumento no risco de infecção por HLGR ($p=0,002$).

Entre os pacientes do grupo com HLGR, 34 (51,5%) eram do sexo masculino e dentre os pacientes sem HLGR, 44 (55,7) eram do sexo masculino ($p=0,61$) (Tabela 4). Entre os 66 pacientes com infecção por HLGR, 22 (33,3%) estavam internados em UTI e 35 (44,3%) dos 79 pacientes com infecção sem HLGR também estavam internados em UTI ($p=0,17$).

A presença de pelo menos uma co-morbidade foi frequente em ambos os grupos. No grupo com HLGR, 61 (92,4%) dos 66 pacientes possuíam pelo menos uma co-morbidade e, no grupo sem HLGR, 67 (84,8%) de 79 possuíam pelo menos uma co-morbidade no momento da internação ($p=0,16$). Quanto à presença ou não de uma

co-morbidade específica, somente tumores hematológicos foram associados à HLGR (p <0,01) (Tabela 4). Não houve diferença na gravidade das co-morbidades entre os pacientes com ICS com HLGR e sem HLGR (p= 0,81) (Tabela 4).

Tabela 4- Características demográficas e clínicas dos pacientes (n) com ICS por *E. faecalis* com alto nível de resistência à gentamicina (HLGR) e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR*	IC** 95%	Valor p
	Com HLGR n= 66	Sem HLGR n= 79			
Idade (anos)					
Mediana	48,5	38			0,008
< 1	0	18 (22,8)			
1–14	1 (1,5)	6 (7,6)			
>14–64	49 (74,2)	40 (50,6)			
≥ 65	16 (24,3)	15 (19,0)			
A cada 10 anos			1,27	1,09–1,47	0,002
Sexo			1,18	0,61–2,28	0,61
Masculino	34 (51,5)	44 (55,7)			
Feminino	32 (48,5)	35 (44,3)			
Internação em UTI			0,63	0,32–1,24	0,17
Sim	22 (33,3)	35 (44,3)			
Não	44 (66,7)	44 (55,7)			
Co-morbidade			2,19	0,73–6,56	0,16
Presente	61 (92,4)	67 (84,8)			
Ausente	5 (7,6)	12 (15,2)			
Co-morbidade					
Hipertensão arterial	14 (21,2)	14 (17,7)	1,25	0,55–2,85	0,59
Tumor sólido	11 (16,7)	14 (17,7)	0,93	0,39–2,21	0,86
Tumor hematológico	18 (27,8)	7 (8,9)	3,86	1,50–9,94	0,005
Insuficiência renal	11 (16,7)	10 (12,7)	1,38	0,55–3,49	0,49
Diabetes Mellitus	10 (15,0)	8 (10,1)	1,59	0,59–4,28	0,36
Pontuação de Charlson					
Mediana (intervalo)	2 (0–6)	2 (0–9)			0,81

* Odds ratio

** Intervalo de confiança

No grupo com ICS por HLGR, a mediana de hospitalização até o primeiro isolamento de *E. faecalis* em sangue foi de 14 dias (intervalo de 0 a 110 dias) e, no grupo sem HLGR, de 13 dias (intervalo de 0 a 90 dias) ($p=0,47$). ICS por *E. faecalis* de origem hospitalar foi freqüente em ambos os grupos, 53 (80,3%) das 66 infecções por HLGR e 62 (78,5%) das 79 sem HLGR foram consideradas infecções de origem hospitalar ($p=0,8$).

Em ambos os grupos de pacientes, procedimento ou presença de dispositivo invasivo foi freqüente, 51 (77,3%) dos 66 pacientes com HLGR e em 58 (73,4%) dos 79 pacientes para o grupo sem HLGR (Tabela 5). A presença de CVD foi mais freqüente no grupo com HLGR, 44 (66,7%) de 66, quando comparado com pacientes sem HLGR, 38 (48,1%) de 79 ($p=0,02$).

Tabela 5- Procedimento realizado ou dispositivo invasivo presente em pacientes (n) com ICS por *E. faecalis* com HLGR e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Com HLGR n= 66	Sem HLGR n= 79			
Procedimento ou dispositivo invasivo			1,23	0,58–2,64	0,59
Presente	51 (77,3)	58 (73,4)			
Ausente	15 (22,7)	21 (26,6)			
Dreno			0,8	0,32–2,01	0,63
Presente	9 (13,6)	13 (16,4)			
Ausente	57 (86,4)	66 (83,6)			
Cirurgia			1,08	0,54–2,17	0,82
Presente	22 (33,3)	25 (31,6)			
Ausente	44 (66,7)	54 (68,4)			
Ventilação mecânica			0,96	0,48–1,92	0,91
Presente	22 (33,3)	27 (34,2)			
Ausente	44 (66,7)	52 (65,8)			
CVD			2,16	1,1–4,24	0,02
Presente	44 (66,7)	38 (48,1)			
Ausente	22 (33,3)	41 (51,9)			
CVC			1,26	0,63–2,54	0,51
Presente	46 (69,7)	51 (64,4)			
Ausente	20 (30,3)	28 (35,4)			

Considerando todas as classes de antibióticos, os pacientes com infecção por HLGR receberam antibioticoterapia mais frequentemente, 46 (69,7%) de 66, quando comparados com aqueles com infecção por isolado sem HLGR, 43 (54,4%) de 79. Contudo, essa diferença não foi significativa ($p=0,06$) (Tabela 6).

Quando comparamos o uso de cada classe de antibiótico, o uso de cefalosporinas, quinolonas e carbapenêmicos foram significativamente maiores no grupo HLGR. Pacientes com HLGR receberam mais frequentemente vancomicina, mas sem significado estatístico ($p=0,07$) (Tabela 6).

Entre os pacientes com infecção sem HLGR, a mediana de dias utilizados de penicilina, sete dias, foi superior à mediana de dias utilizados por pacientes com HLGR, 3 dias, $p=0,002$ (Tabela 7). Em relação aos outros antibióticos, não houve diferença significativa entre os dois grupos.

Tabela 6- Uso de antimicrobianos em pacientes (n) com ICS por *E. faecalis* com HLGR e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Antimicrobianos*	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Com HLGR n= 66	Sem HLGR n= 79			
Uso prévio de antibiótico			1,93	0,97–3,83	0,06
Sim	46 (69,7)	43 (54,4)			
Não	20 (30,3)	36 (45,6)			
Aminoglicosídeos			0,55	0,21–1,46	0,23
Sim	7 (10,6)	14 (17,7)			
Não	59 (89,4)	65 (82,3)			
Penicilinas			0,42	0,14–1,24	0,11
Sim	5 (7,6)	13 (16,5)			
Não	61 (92,4)	66 (83,5)			
Cefalosporinas			1,98	1,02–3,84	0,04
Sim	37 (56,0)	31 (39,2)			
Não	47 (71,2)	69 (87,4)			
Quinolonas			2,79	1,19–6,53	0,02
Sim	19 (28,8)	10 (12,6)			
Não	47 (71,2)	69 (87,4)			
Carbapenêmicos			4,52	1,19–17,20	0,03
Sim	10 (15,1)	3 (3,8)			
Não	56 (84,9)	76 (96,2)			
Vancomicina			2,96	0,87–10,10	0,07
Sim	9 (13,6)	4 (5,0)			
Não	57 (86,4)	75 (95)			
Metronidazol			1,88	0,8–4,12	0,11
Sim	19 (28,8)	14 (17,7)			
Não	47 (71,2)	65 (82,3)			

*Sessenta e três pacientes receberam mais de um antibiótico.

Tabela 7- Tempo de uso de antimicrobianos em dias antes da identificação do primeiro episódio de ICS por *E. faecalis* com HLGR e sem HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 89.

Antibiótico	Com HLGR n= 46 Mediana (dias) (intervalo)	Sem HLGR n= 43 Mediana (dias) (intervalo)	Valor p
Cefalosporina	10 (1–25)	7 (1–35)	0,25
Penicilina	3 (1–4)	7 (4–22)	0,002
Carbapenem	6 (1–33)	19 (4–28)	0,45
Quinolona	10 (2–17)	8,5 (1–20)	0,63
Aminoglicosídeo	8 (2–18)	10 (2–25)	0,60
Vancomicina	7 (1–30)	13 (1–26)	0,75
Metronidazol	12 (1–23)	10 (1–40)	0,36

A frequência de ICSs polimicrobianas foi semelhante em ambos os grupos, ocorrendo em 36 (54,5%) de 66 no grupo com infecção por isolados com HLGR e 34 (43%) de 79 no grupo infectado por isolados sem HLGR (p= 0,17).

Análise de regressão logística multivariada para HLGR

A análise de regressão logística multivariada demonstrou que idade mais avançada, presença de tumor hematológico e uso prévio de vancomicina foram variáveis independentes associadas com ICS por *E. faecalis* com HLGR (Tabela 8).

Tabela 8- Modelo de regressão logística multivariada para ICS por *E. faecalis* com HLGR, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	Níveis de comparação	OR ajustada	IC 95%	Valor p
Idade	A cada 10 anos	1,33	1,13–1,57	<0,001
Tumores hematológicos	Sim/Não	4,92	1,82–13,27	0,002
Uso de vancomicina	Sim/Não	3,93	1,06–14,52	0,04

Evolução

A mortalidade foi semelhante nos dois grupos. Entre os 66 pacientes com ICS por *E. faecalis* HLGR, 33 (50%) foram a óbito versus 34 (43%) entre os 79 sem HLGR. Essa diferença não foi significativa (p= 0,40).

Através da análise de sobrevida pela curva de Kaplan-Meier, também não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p=0,16$) (Figura 1).

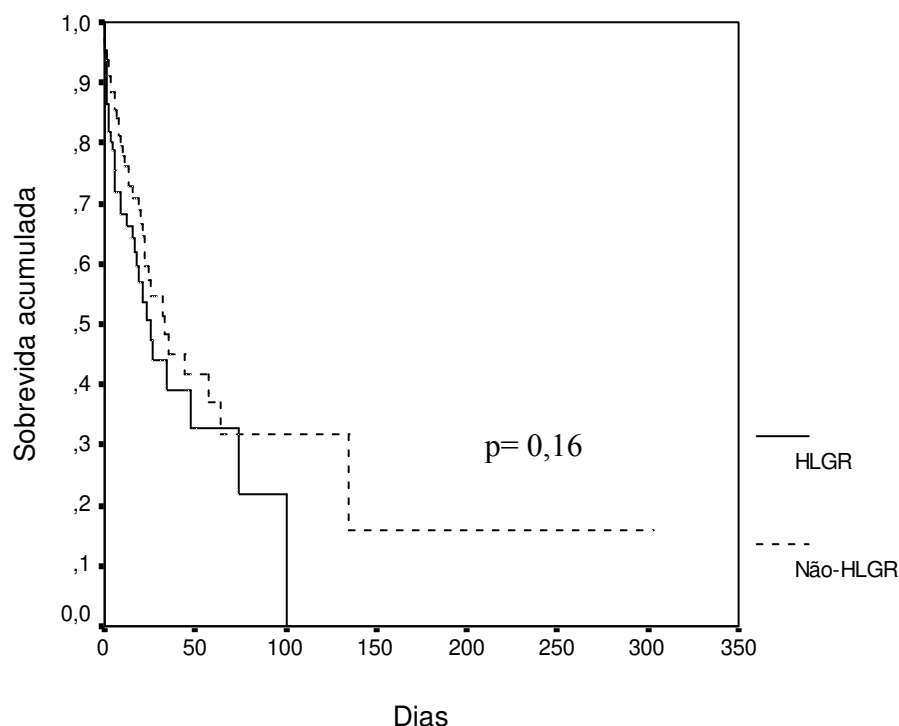


Figura 1- Sobrevida acumulada dos pacientes com ICS por *E. faecalis* com HLGR e sem HLGR por Kaplan-Meier, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, $n=145$.

4.3- Comparação entre pacientes pediátricos e não pediátricos com ICS por *E. faecalis*

Identificamos 25 pacientes pediátricos (idade ≤ 14 anos) com ICS por *E. faecalis*. Infecção por HLGR foi menos freqüente nessa população quando comparados com pacientes não pediátricos. Entre os 25 pacientes pediátricos, 1 (4,0%) apresentou infecção por HLGR e 65 (54,2%) dos 120 pacientes não pediátricos apresentaram infecção por HLGR ($p=0,001$). Em relação ao uso de antimicrobianos, antes da identificação de *E. faecalis* no sangue, não houve diferença entre os dois grupos ($p=0,13$) (Tabela 9). Ao analisarmos cada classe de antimicrobiano, observamos que pacientes pediátricos

utilizaram mais aminoglicosídeos e, por contrapartida, menos cefalosporinas, quinolonas e metronidazol, quando comparados com pacientes não pediátricos. Entre os 25 pacientes pediátricos, 9 (36%) utilizou aminoglicosídeo, 6 (24%) cefalosporina, 1 (4%) quinolona e 1 (4%) metronidazol. Entre os 120 pacientes não pediátricos, 12 (10%) utilizou aminoglicosídeo, 62 (51,7%) cefalosporina, 28 (23,3%) quinolona e 32 (26,7%) metronidazol.

Quanto à realização de procedimentos ou presença de dispositivo invasivo não houve diferença estatística entre os dois grupos ($p= 0,26$) (Tabela 10). Ao avaliarmos cada dispositivo individualmente, observamos que pacientes pediátricos utilizaram menos freqüentemente CVD quando comparados com pacientes não pediátricos ($p= 0,003$); em relação aos demais dispositivos e realização de cirurgia, não observamos diferenças entre os dois grupos.

Através do modelo de regressão logística multivariada, observamos que pacientes pediátricos utilizaram menos freqüentemente CVD e cefalosporinas e mais aminoglicosídeos, quando comparados com pacientes não pediátricos (Tabela 11).

Tabela 9- Uso de antimicrobianos em pacientes (n) pediátricos e não pediátricos com ICS por *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Paciente pediátrico n= 25	Paciente não pediátrico n= 120			
Uso prévio de antibiótico			0,52	0,22–1,23	0,13
Sim	12 (48,0)	77 (64,2)			
Não	13 (52,0)	43 (35,8)			
Aminoglicosídeos			5,06	1,84–13,92	0,002
Sim	9 (36,0)	12 (10,0)			
Não	16 (64,0)	108 (90,0)			
Penicilinas			2,06	0,66–6,41	0,21
Sim	5 (20,0)	13 (10,8)			
Não	20 (80,0)	107 (89,2)			
Cefalosporinas			3,39	1,26–9,07	0,01
Sim	6 (24,0)	62 (51,7)			
Não	19 (76,0)	58 (48,3)			
Quinolonas			0,14	0,02–1,06	0,05
Sim	1 (4,0)	28 (23,3)			
Não	24 (96,0)	92 (76,7)			
Carbapenêmicos			0,38	0,05–3,02	0,08
Sim	0 (0)	13 (10,8)			
Não	25 (100,0)	107 (89,2)			
Vancomicina			0,38	0,05–3,02	0,3
Sim	1 (4,0)	12 (10,0)			
Não	24 (96,0)	108 (90,0)			
Metronidazol			8,72	1,13–67,11	0,03
Sim	1 (4,0)	32 (26,7)			
Não	24 (96,0)	88 (73,3)			

Tabela 10- Procedimento realizado ou dispositivo invasivo presente em pacientes (n) pediátricos e não pediátricos com ICS por *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Paciente pediátrico n= 25 (17,2)	Paciente não pediátrico n= 120 (82,8)			
Procedimento ou dispositivo invasivo			0,2	0,61–5,99	0,26
Sim	21 (84,0)	88 (73,3)			
Não	4 (16,0)	32 (26,7)			
CVC			1,71	0,63–4,6	0,29
Sim	19 (76,0)	78 (65,0)			
Não	6 (24,0)	42 (35,0)			
Cirurgia			0,78	0,30–2,02	0,60
Sim	7 (28,0)	40 (33,3)			
Não	18 (72,0)	80 (66,7)			
CVD			4,29	1,66–11,06	0,003
Sim	7 (28)	75 (62,5)			
Não	18 (72,0)	45 (37,5)			
Ventilação			1,13	0,46–2,77	0,7
Sim	9 (36,0)	75 (62,5)			
Não	16 (64,0)	45 (37,5)			

Tabela 11- Modelo de regressão logística multivariada para ICS por *E. faecalis* em pacientes pediátricos, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	Níveis de comparação	OR ajustada	IC 95%	Valor p
Uso de aminoglicosídeo	Sim/Não	19,23	4,20–87,99	<0,001
Uso de cefalosporinas*	Não/Sim	4,96	1,20–20,46	0,027
Uso de CVD*	Não/Sim	4,97	1,45–17,00	0,01

*A presença da variável foi considerada como o valor de referência.

4.4- Comparação entre os grupos de pacientes com ICS por *E. faecalis* com evolução para óbito e não óbito

Dos 145 pacientes com ICS enterocócica, 67 morreram e a taxa de letalidade global foi de 46,2%. A evolução fatal não pôde ser definitivamente atribuída à infecção enterocócica em nenhum paciente. Este é um estudo retrospectivo e a maioria dos pacientes apresentava infecção por outros agentes microbianos e complicações graves em decorrência de co-morbidades presentes e/ou diagnóstico de internação, o que dificultou determinar a causa específica do óbito.

Análise univariada

A mediana de idade foi maior entre os pacientes que evoluíram para óbito em relação aos que sobreviveram, medianas de 50 anos versus 42,5 respectivamente ($p=0,07$) (Tabela 12). Não houve diferença em relação ao sexo entre os pacientes que morreram e os que sobreviveram ($p=0,75$). Entre os pacientes que evoluíram para óbito, 32 (47,6%) dos 67 pacientes estavam internados em UTI e entre os que sobreviveram, 25 (32%) dos 78, com diferença estatística limítrofe ($p=0,05$).

Tabela 12- Pacientes (n) com envolvimento ou não para óbito quanto às características demográficas e internação em unidade de tratamento intensivo (UTI), HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Óbito n= 67	Vivo n= 78			
Idade (anos)					
Mediana (intervalo)	50 (0–81)	42,5 (0–79)			0,07
< 1	7 (10,5)	11 (14,1)			
1–14	4 (6,0)	3 (3,8)			
>14–64	37 (55,2)	52 (66,7)			
≥ 65	19 (28,3)	12 (15,4)			
Sexo			0,9	0,47–1,73	0,75
Masculino	37 (55,2)	41 (52,6)			
Feminino	30 (44,8)	37 (47,4)			
Internação em UTI			1,94	0,99–3,81	0,05
Sim	32 (47,6)	25 (32,0)			
Não	35 (52,4)	53 (68,0)			

A evolução para óbito foi associada com presença de co-morbidade. Entre aqueles que morreram, 64 (95,5%) de 67 apresentavam pelo menos uma co-morbidade no momento da internação e entre aqueles que sobreviveram, 64 (82,0%) apresentavam pelo menos uma co-morbidade ($p= 0,02$) (Tabela 13). Quando consideramos cada co-morbidade separadamente, somente diabetes foi associada com evolução para óbito ($p= 0,02$).

A gravidade das co-morbidades no momento da internação também influenciou a evolução para óbito. Pacientes que evoluíram para óbito possuíam uma pontuação de Charlson superior àquela apresentada pelos pacientes que sobreviveram ($p= 0,02$) (Tabela 13). A realização de procedimento invasivo ou de dispositivo invasivo este presente em 79,1% dos pacientes que evoluíram para óbito e em 71,8% dos que sobreviveram ($p= 0,31$) (Tabela 14). O uso de ventilação mecânica, CVC e CVD foram significativamente mais frequentes entre os paciente que evoluíram para óbito (Tabela 14).

Tabela 13- Distribuição dos pacientes (n) com evolução ou não para óbito em relação a co-morbidades, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Óbito n= 67	Vivo n= 78			
Co-morbidade*			4,67	1,28–17,02	0,02
Presente	64 (95,5)	64 (82,0)			
Ausente	3 (4,5)	14 (18,0)			
Co-morbidade					
Hipertensão arterial sistêmica			1,73	0,75–3,97	0,2
Sim	16 (23,9)	12 (15,4)			
Não	51(76,1)	66 (84,6)			
Tumor sólido			0,6	0,25–1,47	0,27
Sim	9 (13,)	16 (20,5)			
Não	58 (82,1)	62 (74,5)			
Tumor hematológico			1,09	0,46–2,59	0,84
Sim	12 (17,9)	13 (16,7)			
Não	55 (82,1)	65 (83,3)			
Insuficiência renal					
Sim	9 (13,4)	12 (15,4)	0,85	0,34–2,17	0,74
Não	58 (86,6)	66 (84,6)			
Diabetes Mellitus			3,52	1,18–10,45	0,02
Sim	13 (19,4)	5 (6,4)			
Não	54 (80,6)	73 (93,6)			
Pontuação de Charlson					
Mediana (variação)	2,0 (0–9)	2,0 (0–6)			0,02

* Vinte e oito pacientes apresentaram mais de uma das co-morbidades avaliadas.

Tabela 14- Pacientes (n) com evolução ou não para óbito em relação a procedimento realizado ou dispositivo invasivo presente, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Óbito n= 67	Vivo n= 78			
Procedimentos ou dispositivo invasivo			1,49	0,69–3,21	0,31
Presente	53 (79,1)	56 (71,8)			
Ausente	14 (20,9)	22 (28,2)			
Cirurgia			1,34	0,67–2,68	0,42
Presente	24 (35,8)	23 (29,5)			
Ausente	43 (64,2)	55 (70,5)			
CVC			2,54	1,23–5,27	0,01
Presente	52 (77,6)	45(57,7)			
Ausente	15 (22,4)	33 (42,3)			
Ventilação mecânica			2,87	1,41–5,86	0,004
Presente	31 (46,3)	18 (23,0)			
Ausente	36 (53,7)	60 (77,0)			
CVD			2,01	1,03–3,94	0,04
Presente	44 (65,7)	38 (48,7)			
Ausente	23 (34,3)	40 (51,3)			
Dreno			1,2	0,48–2,97	0,67
Presente	11 (16,4)	11 (14,1)			
Ausente	56 (83,6)	67 (85,9)			

O uso de antimicrobianos associou-se com evolução para óbito ($p= 0,02$) (Tabela 15). Quando comparamos cada classe específica de antimicrobiano, não houve diferença estatística significativa. Pacientes que evoluíram para óbito também receberam maior número de antimicrobianos, mediana= 2 (intervalo de 0 a 5) do que aqueles que sobreviveram, mediana= 1 (intervalo de 0 a 4) ($p= 0,01$).

Tabela 15- Pacientes (n) com evolução ou não para óbito em relação à utilização de antimicrobianos, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	n (%)		OR	IC 95%	Valor p
	Óbito n= 67	Vivo n= 78			
Uso prévio de antimicrobiano			2,28	1,14–4,56	0,02
Sim	48 (71,6)	41 (52,5)			
Não	19 (28,4)	37 (47,5)			
Aminoglicosídeos			2,11	0,82–5,44	0,13
Sim	13 (19,4)	8 (10,2)			
Não	54 (80,6)	70 (89,8)			
Penicilinas			2,62	0,93–7,41	0,07
Sim	12 (17,9)	6 (7,7)			
Não	55 (82,1)	72 (92,3)			
Carbapenêmicos			1,98	0,62–6,37	0,25
Sim	8 (11,9)	5 (6,4)			
Não	59 (88,1)	73 (93,6)			
Cefalosporinas			1,87	0,97–3,62	0,06
Sim	37 (55,2)	31 (39,7)			
Não	30 (44,8)	47 (60,3)			
Quinolonas			1,57	0,69–3,56	0,28
Sim	16 (23,9)	13 (16,7)			
Não	51 (76,1)	65 (83,3)			
Vancomicina			0,99	0,32–3,13	0,1
Sim	6 (8,9)	7 (9)			
Não	61 (91,1)	71 (91)			
Metronidazol			1,54	0,71–3,37	0,28
Sim	18 (26,8)	15 (19,3)			
Não	49 (73,2)	63 (80,7)			

A análise da influência de ICS polimicrobiana sobre a evolução dos pacientes não demonstrou diferença entre os dois grupos ($p= 0,58$). Entre os pacientes que evoluíram para óbito, 34 (50,7%) de 67 apresentaram ICS polimicrobiana e 36 (46,2%) dos 78 que sobreviveram apresentaram ICS polimicrobiana.

No grupo de pacientes com evolução para óbito, a mediana do número de dias entre a hospitalização e o primeiro isolamento de *E. faecalis* foi de 14 (intervalo de 0 a 110 dias) e, no grupo dos que sobreviveram, de 12,5 dias (intervalo de 0 a 90 dias) (p= 0,23).

Análise de regressão logística multivariada para óbito

A análise de regressão logística multivariada demonstrou que o uso de ventilação mecânica e o índice de Charlson, uma estimativa da gravidade das co-morbidades, são variáveis independentes para óbito (Tabela 16).

Tabela 16- Regressão logística multivariada para óbito por ICS por *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

Variável	Níveis de comparação	OR ajustado	IC 95%	Valor p
Ventilação mecânica	Sim/Não	3,58	1,60–8,00	0,002
Índice de Charlson	Variável contínua	1,52	1,12–2,05	0,007

4.5- Análise de tendência da densidade de incidência de ICS por *E. faecalis*

Ao analisarmos a densidade de incidência de ICS por *E. faecalis* ao longo dos anos, não observamos tendência para aumento ou decréscimo significativo durante o período de estudo (p= 0.70) (Figura 2). Nesse período, não identificamos surto. Em 2001, observamos uma maior incidência de ICS, mas não foi considerado surto porque se manteve dentro do intervalo de endemicidade, de 0,09 a 0,36 casos por 1.000 pacientes-dia.

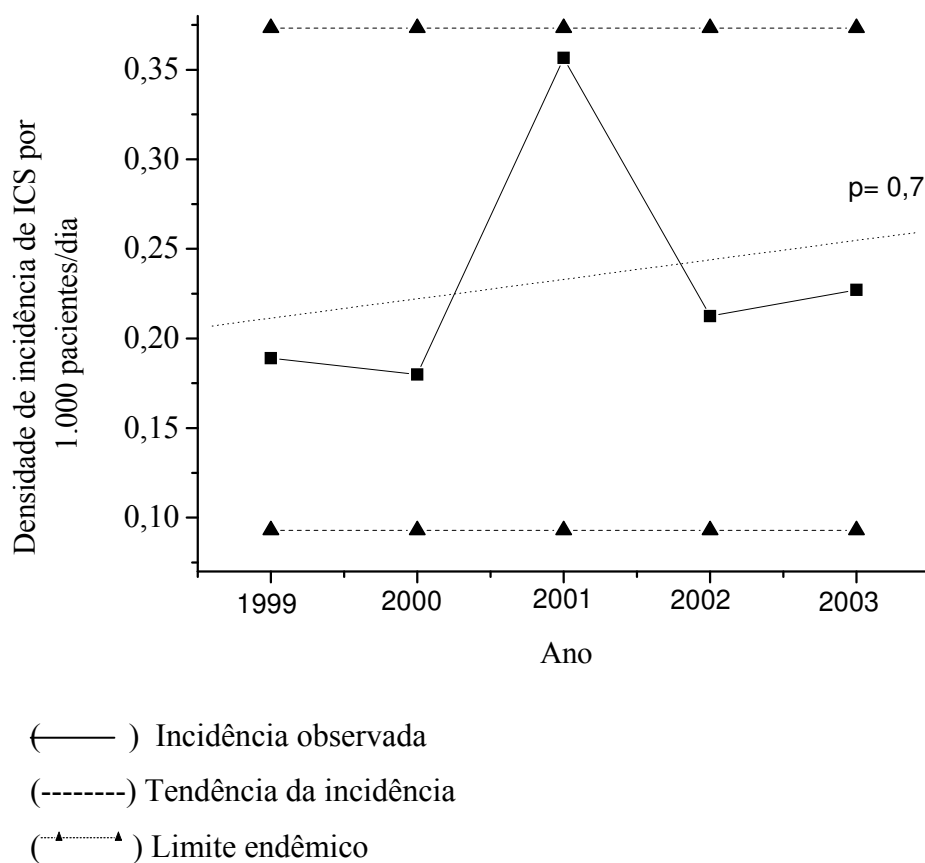


Figura 2- Densidade de incidência de ICS por *E. faecalis* e tendência de casos no HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145.

4.6- Análise microbiológica

Padrão de resistência dos isolados de *E. faecalis*

Em relação aos padrões de resistência *in vitro* dos 145 isolados, observamos que resistência à ciprofloxacina foi a mais freqüente, 70 (51,7%) dos 145 isolados eram resistentes a este antimicrobiano. Resistência à penicilina foi observada em 51 (35,1%) e à estreptomicina em 40 (27,6%). Resistência à ampicilina foi rara, detectada em apenas 3 isolados (2%), dois em 2001 e um em 2003. Nenhum dos isolados de *E. faecalis* apresentava resistência à vancomicina (Tabela 17).

Análise de tendência da resistência antimicrobiana de *E. faecalis*

A análise de tendência da resistência dos *E. faecalis* aos antimicrobianos, em cada ano do estudo, demonstrou que não houve tendência significativa para aumento ou decréscimo na frequência (Tabela 17). O aumento das frequências de resistência, entre 1999 e 2003, à ampicilina, à penicilina, à ciprofloxacina e à gentamicina não foram significativos.

Em relação à estreptomicina, houve um decréscimo na resistência de 7 (31,8 %) de 22 isolados em 1999 para 3 (10,7%) de 28 isolados em 2003, mas sem diferença estatística ($p=0.44$) (Tabela 17).

Tabela 17- Análise de tendência da resistência antimicrobiana dos isolados (n) de *E. faecalis* em sangue no HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145*.

Antibiótico	Ano					Total n= 145	Valor p
	1999 n= 22	2000 n= 23	2001 n= 45	2002 n= 27	2003 n= 28		
Ampicilina	0 (0)	0 (0)	2 (4,4)	0 (0)	1 (3,6)	3 (2,0)	0,45
Ciprofloxacina	7 (31,8)	11 (47,8)	25 (55,6)	15 (55,5)	12 (42,9)	70 (51,7)	0,42
Gentamicina	8 (36,4)	11 (47,8)	21 (46,7)	13 (48,1)	13 (46,4)	66 (45,5)	0,54
Penicilina	6 (27,3)	10 (43,5)	18 (40)	9 (33,3)	8 (28,6)	51 (35,1)	0,70
Estreptomicina	7 (31,8)	6 (26,1)	11 (24,4)	13 (48,1)	3 (10,7)	40 (27,6)	0,44
Vancomicina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Encontramos uma associação significativa entre HLGR e resistência à ciprofloxacina. Entre os 66 isolados com HLGR, 92,4% eram também resistentes à ciprofloxacina. Em contraste, somente 9 (11,3%) dos 79 *E. faecalis* isolados com suscetibilidade à gentamicina mostraram resistência à ciprofloxacina ($p < 0,001$). Em relação à penicilina, também houve associação, 48 (94,1%) dos isolados HLGR eram

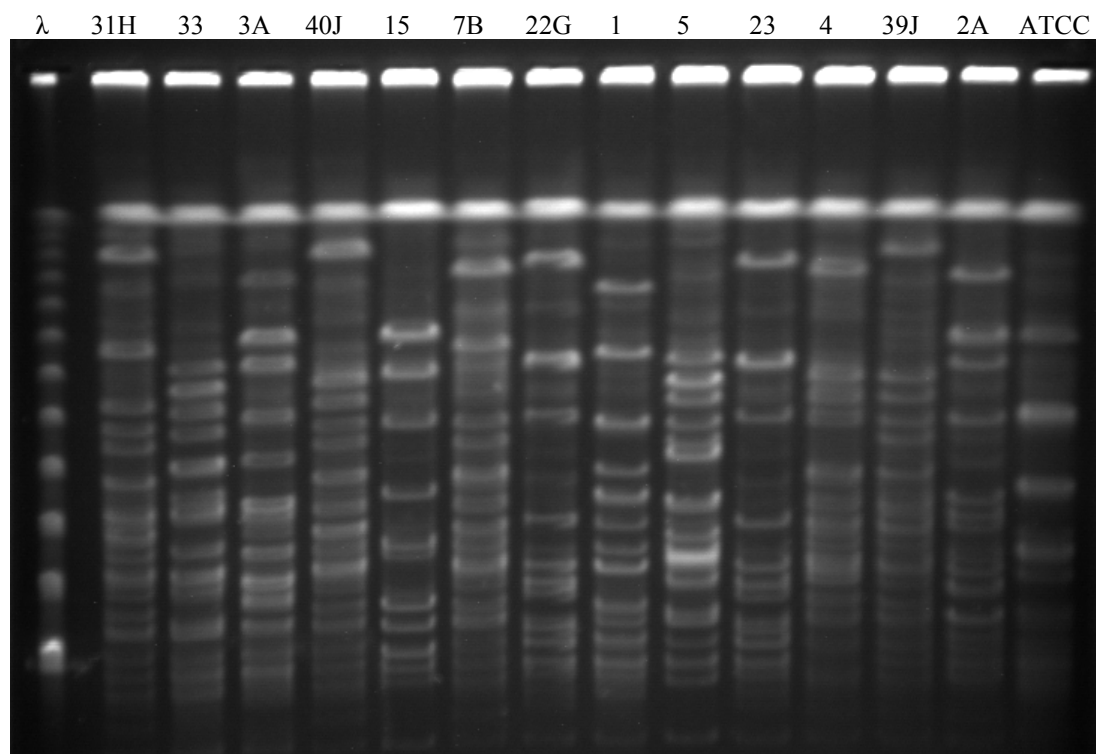
também resistentes à pencilina e somente 3 (5,9%) dos 79 isolados com suscetibilidade à gentamicina mostraram resistência à pencilina ($p < 0,001$). Em relação aos antibióticos ampicilina, estreptomicina e vancomicina não houve associação. Vinte e dois (15,1%) dos 145 *E. faecalis* possuíam simultaneamente alto nível de resistência à estreptomicina e HLGR.

4.7- Análise molecular dos isolados

Realizamos a genotipagem de todos os isolados obtidos de hemocultura e armazenados no banco de bactérias durante o período do estudo. Nesse banco estavam armazenados 32 isolados obtidos de 32 pacientes incluídos no estudo e outros 12 isolados provenientes de um mesmo paciente em diferentes episódios de bacteremia, de paciente não internado no momento em que ocorreram os episódios de bacteremia e de pacientes cujos prontuários não foi possível recuperarmos. Esses 12 isolados foram considerados controles.

Não foi possível realizar a análise molecular dos demais isolados obtidos dos demais pacientes incluídos porque os mesmos não foram armazenados no banco de bactérias na época em que foram obtidos.

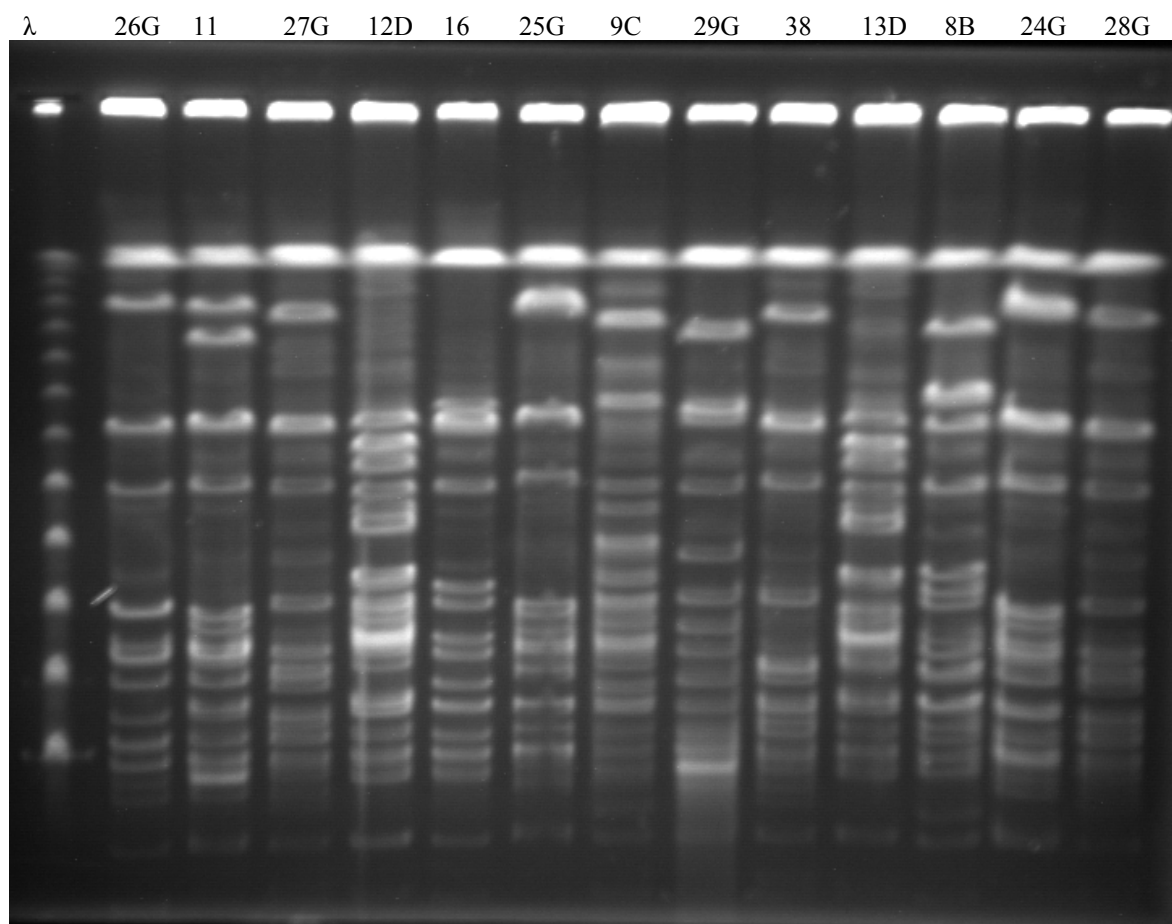
Todos os perfis moleculares obtidos através da técnica de PFGE estão demonstrados nas figuras 3a, 3b, 3c e 3d. Vinte e nove isolados foram agrupadas em 11 perfis moleculares principais denominados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e L. Os isolados 1, 4, 5, 6, 11, 15, 16, 17, 30, 33, 34, 35, 38, 41, 44 apresentaram perfis moleculares únicos.



Isolado	Unidade de internação	Data hemocultura	Perfil de sensibilidade				
			Ampi	Cipro	HLGR	Estrepto	Peni
31H	Pronto socorro	16/11/2001	S	R	R	S	R
33	Cirurgia do trauma	12/01/2002	S	R	R	R	S
3A	TMO	17/10/2002	S	R	R	S	R
40J	Medicina interna	19/09/2002	S	R	R	S	R
15	Unidade coronariana	20/10/2001	S	S	S	S	S
7B	Hematologia	06/12/1999	S	R	R	S	R
22G	Emergência clínica	21/01/2002	S	S	S	S	S
1	UTI	04/02/2001	S	R	S	S	S
5	TMO	28/03/2002	S	R	R	R	R
23G	Não internado	27/03/2000	S	S	S	S	S
4	UTI	07/07/2000	S	R	R	S	S
39J	Cirurgia do trauma	08/06/2001	S	R	R	R	R
2A	Pronto socorro	02/11/2001	S	R	R	S	R

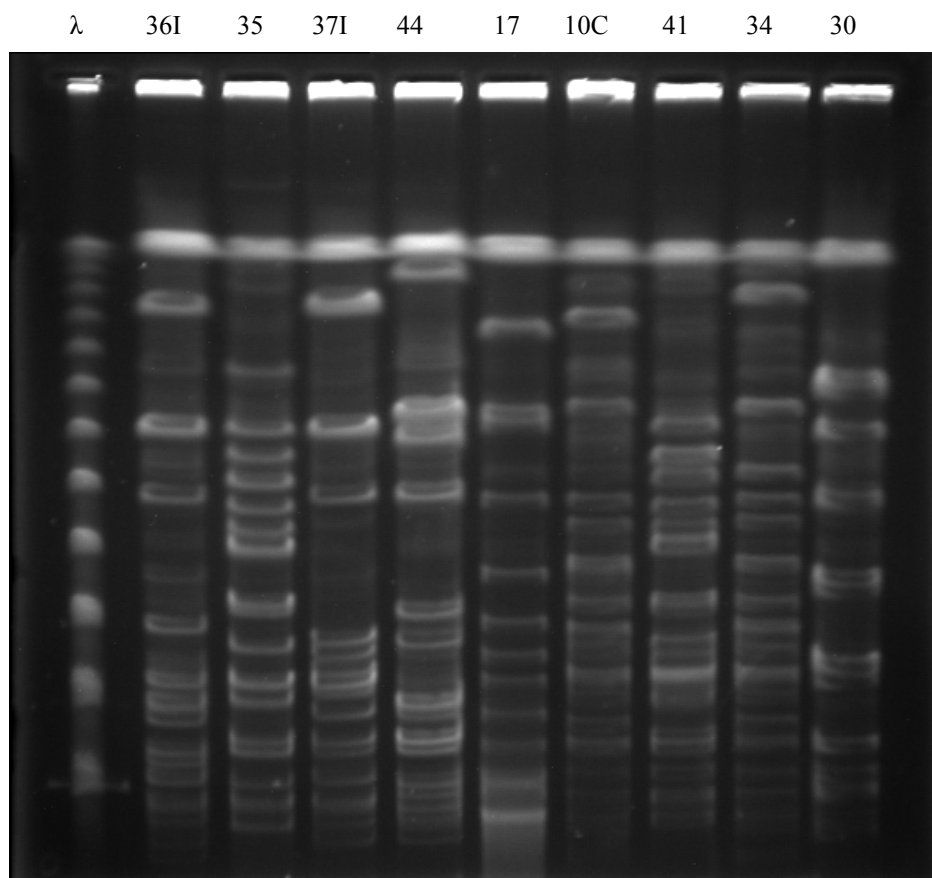
λ (marcador de peso molecular), ATCC (*E. faecalis* ATCC 29212), TMO (unidade de transplante de medula óssea), UTI (unidade de tratamento intensivo), Amp (ampicilina), Cipro (ciprofloxacina), Estrepto (estreptomicina), Peni (penicilina), S (sensível) e R (resistente)

Figura 3a- Resultados dos perfis moleculares de isolados de *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145



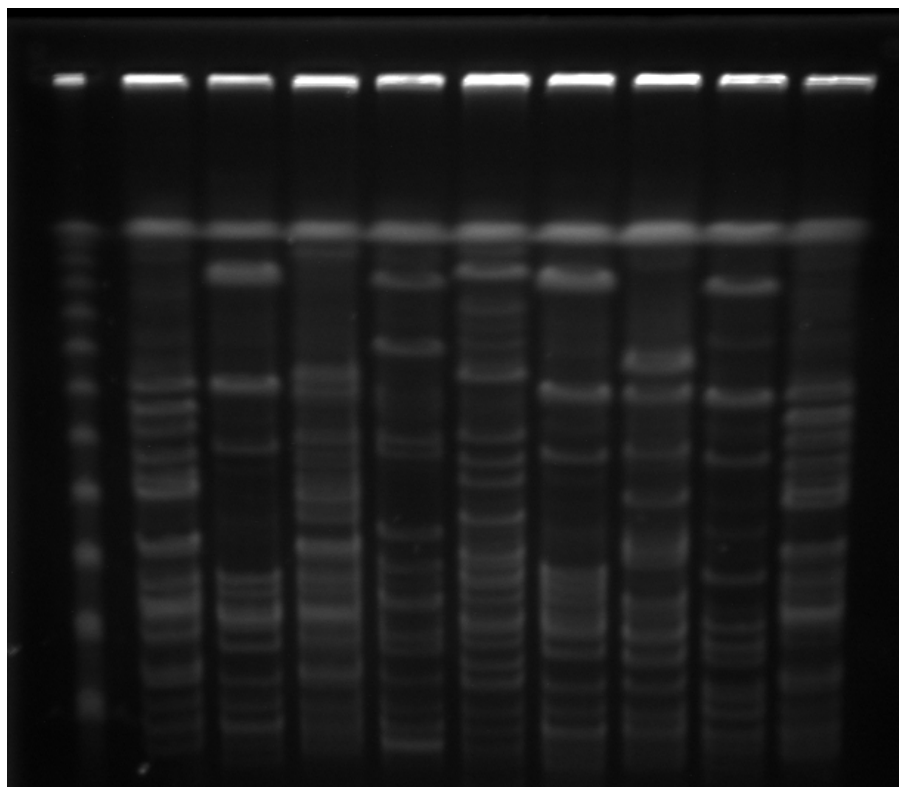
Isolado	Unidade de internação	Data hemocultura	Perfil de sensibilidade				
			Ampi	Cipro	HLGR	Estrepto	Peni
26G	Cirurgia do trauma	08/06/1999	S	R	R	S	R
11	UTI pediátrica	31/03/2000	S	S	S	S	S
27G	Cirurgia do trauma	16/06/1999	S	R	R	S	R
12D	Hematologia	14/03/2002	S	R	R	R	R
16	Oncologia	07/10/2001	S	R	S	R	S
25G	Desconhecida	18/03/2000	S	S	S	S	S
9C	Cardiologia	31/10/1999	S	S	S	S	S
29G	Emergência clínica	28/04/2000	S	S	S	S	S
38	UTI	15/03/2001	S	S	S	S	S
13D	Hematologia	26/04/2002	S	R	R	R	R
8B	Desconhecida	30/12/1999	S	S	S	S	S
24G	Emergência clínica	19/12/2001	S	R	R	S	R
28G	Não internado	14/03/2000	S	S	S	S	S

Figura 3b- Resultados dos perfis moleculares de isolados de *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145



Isolado	Unidade de internação	Data hemocultura	Perfil de sensibilidade				
			Ampi	Cipro	HLGR	Estrepto	Peni
36I	UTI	17/03/2001	S	S	S	S	S
35	Emergência clínica	12/07/2000	S	R	R	R	R
37I	Unidade coronariana	28/02/2001	S	S	S	S	S
44	Pronto socorro	02/07/2001	S	S	S	S	S
17	Dermatologia	08/08/2000	S	R	R	S	R
10C	Não internado	21/12/1999	S	R	R	R	R
41	UTI neonatal	11/11/1999	S	S	S	S	S
34	TMO	21/10/2001	S	R	R	S	R
30	Neuroclínica	03/05/2001	S	S	S	S	S

Figura 3c- Resultados dos perfis moleculares de isolados de *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145



Isolado	Unidade de internação	Data hemocultura	Perfil de sensibilidade				
			Ampi	Cipro	HLGR	Estrepto	Peni
42L	TMO	20/09/2002	S	R	R	R	R
18E	Neonatologia	16/06/1999	S	S	S	S	S
14D	TMO	31/05/2002	S	R	R	R	R
20F	UTI pediátrica	12/06/1999	S	S	S	R	S
32H	Reumatologia	16/10/2001	S	R	R	S	R
19E	Cirurgia do trauma	25/01/2002	S	R	R	R	S
6	Moléstias infecciosas	08/01/1999	S	S	R	R	S
21F	Não internado	08/02/2000	S	S	S	S	S
43L	TMO	22/03/2002	S	R	R	R	R

Figura 3d- Resultados dos perfis moleculares de isolados de *E. faecalis*, HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 145

Na figura 4, está demonstrado o dendrograma formado a partir das relações de similaridade entre as cepas. A Tabela 18 mostra a distribuição dos perfis moleculares das cepas de *E. faecalis*, a unidade de internação do paciente e a suscetibilidade antimicrobiana à ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, estreptomicina e penicilina.

Os isolados dos perfis B, C, E, F e G, J apresentaram variabilidade no padrão de sensibilidade antimicrobiana. Por outro lado, os isolados nos perfis A, D, H, I e L apresentaram padrão de suscetibilidade antimicrobiana igual (Tabela 18).

As cepas A e E são compostas por isolados obtidos com intervalo de tempo superior a 1 ano e provenientes de pacientes internados em unidades do hospital sem proximidade geográfica (Tabela 18). Em relação às cepas F e J observamos intervalo de tempo superior a um ano entre a obtenção de cada isolado. O intervalo de tempo entre o isolamento das cepas pertencentes aos perfis B, C e H foi menor, variando de 24 a 45 dias (Tabela 18).

Alguns isolados pertencentes à cepa G foram obtidos com intervalo de tempo superior a um ano e pertenciam, na sua maioria, a pacientes internados nas unidades de emergência clínica e cirurgia do trauma que possuem proximidade geográfica no hospital. O mesmo observamos em relação à cepa I, composta por isolados obtidos de pacientes internados em unidades com proximidade geográfica, UTI e unidade coronariana, obtidos com um intervalo de 30 dias (Tabela 18). Isolados das cepas D e L, assim como o isolado 5, foram obtidas de um mesmo paciente que apresentou 6 episódios de bacteremia durante um período de 6 meses. Os isolados 26 e 27 da cepa G também foram obtidos de um mesmo paciente com um intervalo de 8 dias.

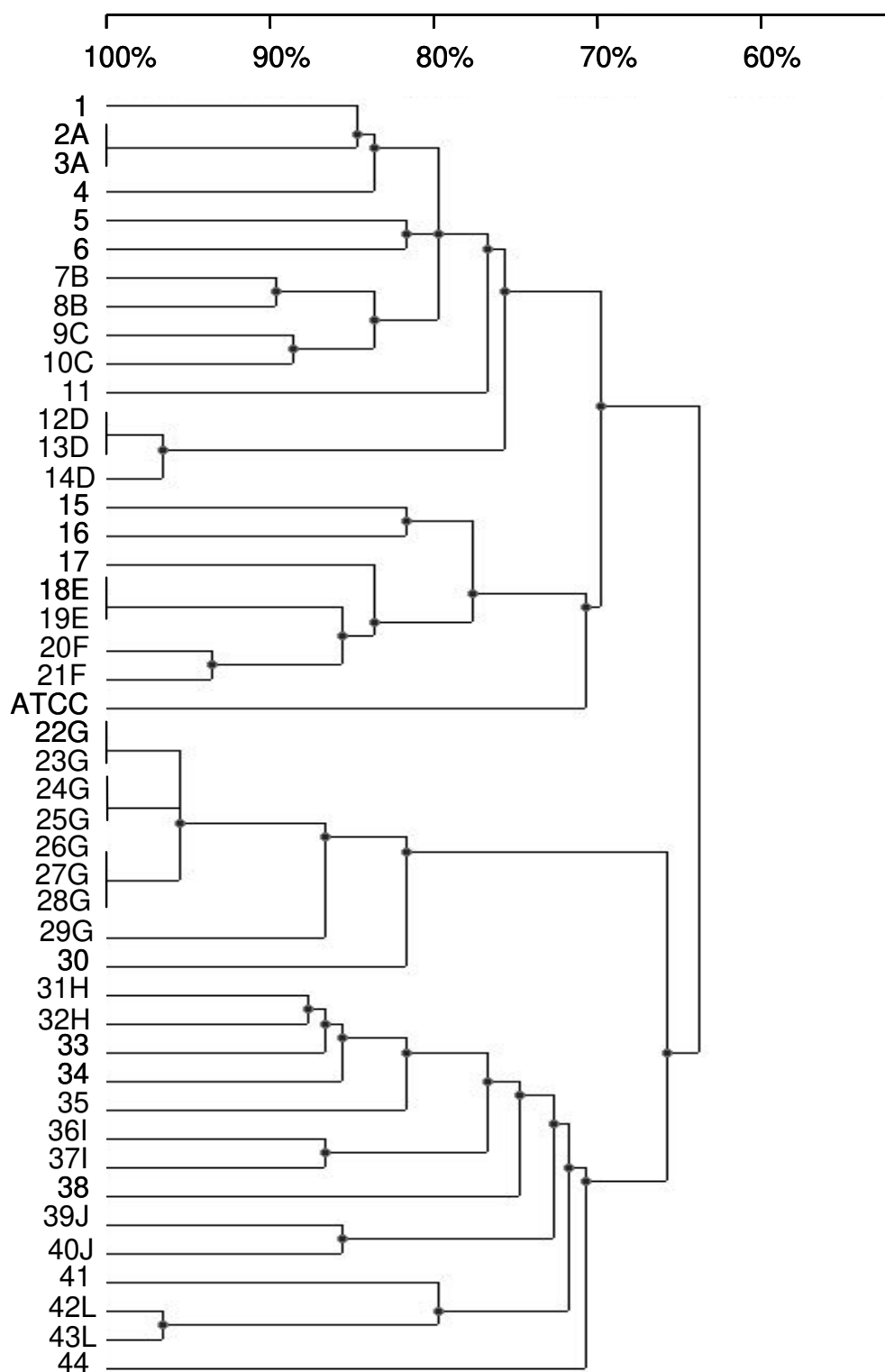


Figura 4- Dendrograma demonstrando os diferentes perfis moleculares das cepas de *E. faecalis* isoladas em corrente sanguínea, obtidas através da técnica de PFGE, n= 44. Figura elaborada pelo programa Biogene® software, Vilbert-Loumart, França.

Tabela 18- Perfis moleculares obtidos por PFGE de cepas de *E. faecalis* isolados em sangue no HC-Unicamp, janeiro de 1999 a dezembro de 2003, n= 29.

Isolado	Unidade de internação	Data hemocultura	Perfil de sensibilidade				
			Ampi	Cipro	Genta	Estrepto	Peni
2A	Pronto socorro	02/11/2001	S	R	R	S	R
3A	TMO	17/10/2002	S	R	R	S	R
7B	Hematologia	06/12/1999	S	R	R	S	R
8B	Desconhecida	30/12/1999	S	S	S	S	S
9C	Cardiologia	31/10/1999	S	S	S	S	S
10C	Não internado	21/12/1999	S	R	R	R	R
12D	Hematologia	14/03/2002	S	R	R	R	R
13D	Hematologia	26/04/2002	S	R	R	R	R
14D	TMO	31/05/2002	S	R	R	R	R
18E	Neonatologia	16/06/1999	S	S	S	S	S
19E	Cirurgia do trauma	25/01/2002	S	R	R	R	S
20F	UTI pediátrica	12/06/1999	S	S	S	R	S
21F	Não internado	08/02/2000	S	S	S	S	S
22G	Emergência clínica	21/01/2002	S	S	S	S	S
23G	Cirurgia do trauma	27/03/2000	S	S	S	S	S
24G	Emergência clínica	19/12/2001	S	R	R	S	R
25G	Desconhecida	18/03/2000	S	S	S	S	S
26G	Cirurgia do trauma	08/06/1999	S	R	R	S	R
27G	Cirurgia do. trauma	16/06/1999	S	R	R	S	R
28G	Não internado	14/03/2000	S	S	S	S	S
29G	Emergência clínica	28/04/2000	S	S	S	S	S
31H	Pronto socorro	16/11/2001	S	R	R	S	R
32H	Reumatologia	16/10/2001	S	R	R	S	R
36I	UTI	17/03/2001	S	S	S	S	S
37I	Unidade coronariana	28/02/2001	S	S	S	S	S
39J	Não internado	8/06/2001	S	R	R	R	R
40J	Medicina interna	19/09/2002	S	R	R	S	R
42L	TMO	20/09/2002	S	R	R	R	R
43L	TMO	22/03/2002	S	R	R	R	R

TMO= transplante de medula óssea, UTI= unidade de tratamento intensivo, Amp= ampicilina, Cipro= ciprofloxacina, Genta= gentamicina, Estrepto= estreptomicina, Peni= penicilina, S= sensível, R= resistente.

5- DISCUSSÃO

A incidência de ICSs hospitalares aumentou continuamente nas últimas duas décadas. Razões para este aumento incluem o aumento da sobrevida de pacientes graves, concomitante a um aumento no tempo de hospitalização, maior utilização de dispositivos invasivos como cateteres e drenos e aumento na frequência da realização de cirurgias de grande porte (Gaynes e Edwards, 2005). Apesar dos progressos no tratamento das ICSs, a letalidade nesses quadros permanece alta (Wenzel e Edmond, 2001). O estudo da epidemiologia das ICSs em um hospital é importante para auxiliar no controle dessas infecções, assim como otimizar o seu tratamento. Dados desses estudos possibilitam a identificação de surtos, monitorização da incidência de um determinado agente etiológico e seu perfil de suscetibilidade antimicrobiana, permitindo a elaboração de protocolos de antibioticoterapia empírica. Além disso, é possível o estudo de variáveis associadas com essas infecções por agente específico.

Ao avaliarmos a epidemiologia das ICSs por *E. faecalis* no HC-Unicamp, comparando-a com dados mundiais, observamos tendências semelhantes. Estudos demonstraram aumento na incidência das ICSs por enterococo na década de 80 e início da década de 90 (Whiteside et al., 1983; Maki e Agger, 1988). Christie et al. (1994) observaram um aumento da frequência de ICS hospitalar por enterococos de 4% em 1986 para 10% em 1991. No final da década de 90, observou-se uma estabilização na frequência das infecções enterocócicas. No estudo de Lerma et al. (2003), realizado entre 1997 e 2001, não foi observada diferença estatística nas incidências anuais de infecções enterocócicas. Entre 1999 e 2001, a incidência de ICSs por *E. faecalis* também se manteve sem alterações significativas no estudo de Saeedi et al. (2004). Da mesma forma, não encontramos uma tendência no aumento da incidência de ICSs por *E. faecalis* entre os anos de 1999 a 2003. É possível que em nosso hospital, assim como nos hospitais citados, a incidência de ICSs por *E. faecalis* tenha aumentado em anos anteriores aos avaliados em nosso estudo e já estivessem estabilizadas durante o período de estudo.

Os achados do nosso estudo evidenciam que pacientes com ICS por *E. faecalis* são mais jovens, mediana de 45 anos, quando comparados com pacientes de outros hospitais, mediana de 55 a 69 anos (Antalek et al., 1995; Noskin et al., 1995; Patterson et al. 1995; Routsis et al., 2000). Pela escassez de dados do Brasil, não podemos

concluir se esta é uma característica geral do Brasil ou específica do HC-Unicamp. Nossos achados também evidenciam que pacientes com ICS por *E. faecalis* são doentes graves, como demonstrado pela freqüente presença de graves co-morbidades e de dispositivos invasivos ou realização de procedimentos invasivos e uso freqüente de antibioticoterapia. No estudo de Maki e Agger (1988), 77% dos pacientes com ICS enterocócica possuíam cateter urinário ou intravascular e 86% apresentavam pelo menos uma co-morbidade grave. Fernandes et al. (2004) encontraram que 85% dos pacientes com ICS por *E. faecalis* haviam sido submetidos a procedimento ou possuíam dispositivos invasivos, 58% apresentavam pelo menos uma co-morbidade e 41% haviam recebido antibioticoterapia de amplo espectro. Esses achados corroboram o fato dos enterococos possuírem baixa virulência e causarem ICS em pacientes graves e com portas de entrada.

Enterococos podem atingir a corrente sanguínea a partir de portas de entrada específicas, como dispositivos e procedimentos invasivos, ou a partir de colonização intestinal, quando falhas das barreiras presentes no trato gastrintestinal permitem o acesso da bactéria à circulação portal. Além das barreiras físicas do trato gastrintestinal, o sistema retículo endotelial também tem que ser superado pela bactéria (Mundy, 2000). A quantidade de inóculo pode saturar a capacidade de eliminação das células de Kupffer, ou co-morbidades presentes alteram a função retículo endotelial. Stone et al. (1974) observaram alteração da função endotelial hepática secundária à utilização de drogas como antibióticos e corticoesteróides. Dessa forma, enterococemia em muitos pacientes pode ser resultado de falhas dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Em ICSs polimicrobianas é comum a presença de enterococo. Os principais microorganismos envolvidos nessas infecções são bacilos Gram negativos seguidos por cocos Gram positivos; entre os últimos, *E. faecalis* e *S. aureus* são os mais freqüentes (Reuben et al., 1989). Entre pacientes com ICS por *E. faecalis*, a freqüência de ICS polimicrobiana encontrada em nosso estudo está próxima àquela relatada na literatura, aproximadamente 40% (Caballero-Granando et al., 1998; Christie et al., 1994; Maki e Agger, 1988). Essa alta freqüência encontrada por nós e aquela relatada em alguns estudos da literatura pode ser justificada pelo fato de pacientes com ICS enterocócica apresentarem características específicas, como presença de portas de entrada, internação hospitalar

prolongada e co-morbidades, as quais tornam os pacientes mais suscetíveis a ICS por diferentes agentes simultaneamente (Cooper et al., 1990; Reuben et al., 1989; Siegaman-Ingra et al., 1988).

A taxa de letalidade entre pacientes com ICS por enterococos é alta, variando entre 30% a 68% (Hoge et al., 1991; Jones, 1985; Landry et al., 1989; Maki e Agger, 1988). Na presente investigação, a letalidade foi de 46,2%. A variabilidade nas taxas de letalidade encontrada na literatura pode estar relacionada a diferenças na gravidade das co-morbidades entre as populações estudadas e diferentes desenhos de estudo. O papel do enterococo na evolução para óbito ainda é controverso, uma vez que outras possíveis causas de óbito estão freqüentemente presentes (Hoge et al., 1991; Huycke et al., 1991; Venditti et al., 1993). Tanto o nosso estudo como estudos prévios demonstraram que as variáveis associadas com evolução para óbito em pacientes com ICS por enterococo associam-se com a gravidade do paciente (Caballero-Granando et al., 1998; Landry et al., 1989; Noskin et al., 1995; Watanakunakorn et al., 1993).

Para o adequado tratamento de pacientes com ICS, é importante a suspeita clínica precoce, exames diagnósticos, terapia antimicrobiana apropriada, medidas de suporte e controle de co-morbidades (Diekema et al. 2003; Weinstein et al., 1997;). Terapia antimicrobiana precoce contribui para uma evolução favorável em pacientes com ICS e a seleção de antimicrobiano a utilizar deve ser preferencialmente baseada no sítio de infecção e em taxas de suscetibilidade locais (Karlowski et al., 2004; Munson et al., 2003; Weinstein et al., 1997).

Graninger e Ragette (1992) demonstraram letalidade de 37% entre pacientes com ICS por enterococos que receberam antibioticoterapia apropriada no início da infecção e letalidade de 100% entre pacientes que receberam terapia inapropriada. No estudo de Fernandez et al (2004), tratamento inapropriado de ICS por enterococos e ventilação mecânica foram associados à evolução para óbito. Nossos achados sugerem que o tratamento empírico para ICS enterocócica deve ser considerado em determinadas situações clínicas, enquanto os resultados de cultura de sangue são aguardados. Essas situações incluem pacientes com evidência clínica e laboratorial de ICS, hospitalizados por período prolongado, utilizando antimicrobianos e dispositivos invasivos como cateterização

vascular ou urinária. Pacientes com ICS por *E. faecalis* são freqüentemente graves e com alta taxa de letalidade, por esses motivos, ressaltamos a importância de tratamento precoce e apropriado.

A prevalência de ICS causada por enterococo com HLGR é variável, 14% a 63 %, de acordo com diferentes hospitais e períodos de estudo, conforme descrito no Anexo 3 (Antalek et al., 1995; Huycke et al., 1991; Noskin et al., 1991; Saeedi et al., 2004). A freqüência de HLGR por nós encontrada (45,5%) assemelha-se àquela observada em estudos realizados em hospitais com características semelhantes ao nosso. No Brasil, a prevalência de HLGR entre enterococos é de 15% a 70% (Cardoso et al., 1996; Ribas e Congijo, 1998; Sader et al., 1999). Essa variabilidade na prevalência de HLGR decorre provavelmente da combinação de diferentes fatores. A comparabilidade entre os estudos é difícil, especialmente em relação aos estudos brasileiros, nos quais se incluíram isolados de amostras clínicas além de sangue. Vale lembrar que nenhum estudo nacional avaliou a presença de HLGR exclusivamente em amostras de hemocultura. Além disso, outros fatores podem influenciar na variabilidade da prevalência de HLGR, como a gravidade dos pacientes acometidos, tempo de internação hospitalar e complexidade do hospital.

A origem das infecções por enterococo HLGR pode ser do próprio paciente ou do ambiente hospitalar. Na primeira situação, o enterococo HLGR já está presente na flora intestinal do paciente antes da internação hospitalar. Estudos indicam que a prevalência de enterococos HLGR em pessoas fora do ambiente hospitalar é na ordem de 7% a 14% (Nys et al., 2005; Silverman et al., 1998). No segundo caso, o paciente contamina-se com bactéria presente no ambiente hospitalar (Pournaras, 2000).

A tipagem molecular dos *E. faecalis* incluídos neste estudo demonstrou uma grande variabilidade entre isolados, o que pode sugerir a seleção de isolados da flora intestinal endógena de pacientes. Encontramos um menor número de isolados de *E. faecalis* com perfis moleculares idênticos ou relacionados, sugerindo pertencerem a uma mesma cepa, obtidos de pacientes distintos, internados em enfermarias próximas, provavelmente fruto da disseminação de um paciente para outro. Também observamos que algumas cepas de *E. faecalis* permaneceram no hospital por longos períodos de tempo, permitindo a

transmissão entre pacientes, e exemplificando a dificuldade do controle dessas infecções no ambiente hospitalar.

Uma limitação do nosso estudo é o número reduzido de isolados disponíveis para tipagem molecular, em decorrência dos isolados de *E. faecalis* não terem sido encaminhados para o armazenamento no banco de bactérias. Esse número reduzido pode comprometer em algum grau os achados moleculares do nosso estudo.

Estudos prévios demonstraram que isolados de enterococos HLGR possuem perfis moleculares por PFGE idênticos (Papaparaskevas et al., 2000; Wells et al., 1992; Zarrilli et al., 2005). Em nosso estudo, não observamos associação entre HLGR e perfis moleculares específicos. Isolados relacionados ou idênticos pela análise molecular apresentaram variabilidade na suscetibilidade à gentamicina, o que sugere a transferência de material genético que confere HLGR entre isolados (Christie et al., 1994; Murray et al., 1990). Esses fatores evidenciam que o PFGE é um método de tipagem molecular adequado para estudar a disseminação clonal e a epidemiologia molecular das infecções enterocócicas, porém é de limitado valor para estudar a emergência e disseminação das bases moleculares para a resistência bacteriana. Outros métodos, como a análise de genes de resistência a aminoglicosídeos por PCR multiplex, são mais adequados para avaliar a transferência de resistência bacteriana (Zarrilli et al., 2005).

Surtos no ambiente hospitalar podem ocorrer em decorrência da transmissão de patógenos de um paciente para outro. De acordo com a nossa análise molecular, o pequeno número de isolados por cepas sugere que a transmissão de *E. faecalis* entre pacientes foi esporádica. Essas informações auxiliam em estratégias de controle de infecção, ao possibilitar a distinção entre surto e situação endêmica. A literatura indica que diferentes intervenções são mais apropriadas para um tipo de controle do que outro (Mundy et al., 2000). O controle de surto por bactéria multi-resistente envolve a formulação de hipótese sobre reservatório e modo de transmissão e medidas de bloqueio. Em situação endêmica, as principais medidas envolvem isolamento de contato, uso racional de antimicrobianos, treinamento dos profissionais da saúde e culturas de vigilância.

Na década de 90, a prevalência de enterococos HLGR no mundo dobrou de aproximadamente 15% para 30% e demonstrou-se, através de análise molecular, que a disseminação de cepas HLGR de um paciente para outro contribuiu para esse aumento (Lavery et al., 1997; Saeedi et al., 2004; van Den Braak et al., 1999). No primeiro ano (1999) do nosso estudo, já encontramos uma frequência elevada de ICS por *E. faecalis* HLGR (36,4%) e não verificamos tendência significativa no aumento ou decréscimo dessa frequência até 2003. Durante esse período a disseminação de cepas ocorreu de forma esporádica, o que pode ter contribuído para o não aumento da prevalência de HLGR. Assim como nos casos de ICS por *E. faecalis*, o aumento da incidência de *E. faecalis* HLGR no HC-Unicamp pode ter ocorrido na década de 90, em anos anteriores ao início do nosso estudo, assim como em outros hospitais.

Infecção por enterococos HLGR, segundo alguns estudos, é mais frequente em pacientes com longo tempo de hospitalização, tratados previamente com antibióticos, com cateterização urinária e com co-morbidade grave (Axelrod e Talbot, 1989; Viaggapan e Holliman, 1999; Wells et al., 1992; Zervos et al., 1987b). Pacientes com este perfil são mais frequentemente encontrados em UTIs. Nesse contexto, é esperada uma associação entre ICS por *E. faecalis* HLGR e internação em UTI. Contudo, a literatura é discordante sobre associação entre HLGR e internação em UTI (Antalek et al., 1995; Huycke et al., 1991; Wells et al., 1992;). Nós não encontramos essa associação. O HC-Unicamp é um hospital terciário de alta complexidade, cujos pacientes com características associadas à infecção por HLGR encontram-se internados, além da UTI, em outras unidades de internação do hospital como enfermaria de retaguarda, cirurgia do trauma, hematologia e moléstias infecciosas. Possivelmente, por isso internação em UTI especificamente não esteja relacionada com ICS por *E. faecalis* HLGR no HC-Unicamp.

Em nosso estudo, nenhum dos pacientes com menos de um ano de idade apresentou infecção por HLGR e entre aqueles com idade entre um e 14 anos a presença de HLGR foi pouco frequente. Além disso, os pacientes do nosso hospital com HLGR apresentaram idade mais avançada quando comparados com pacientes sem HLGR. Christie et al. (1994) ao estudarem ICS enterocócica em um hospital de ensino pediátrico também encontraram baixa taxa de HLGR (2%). A fim de interpretar esses achados, especulamos

que pacientes pediátricos apresentaram menor taxa de infecção por HLGR devido ao uso mais criterioso de antimicrobianos nessa população, uma equipe de profissionais da saúde mais restrita e maior adesão às normas de precauções universais e de isolamento. Tais aspectos podem contribuir para a redução da seleção de isolados HLGR e transmissão hospitalar.

O programa SENTRY encontrou diferenças em relação a idade e suscetibilidade antimicrobiana entre patógenos causadores de ICS (Diekema et al., 2002). Enterococos eram mais freqüentemente resistentes, nesse caso, à vancomicina, entre adultos do que entre crianças e não foram detectados VRE causando ICS em crianças menores de um ano (Diekema et al., 2002). Há necessidade de novos estudos para serem melhor esclarecidas as origens dessa diferença.

De acordo com os nossos dados, a mediana de dias entre a admissão hospitalar e o isolamento de *E. faecalis* não foi diferente entre pacientes com enterococo HLGR em relação a pacientes sem HLGR. No entanto, em outros estudos da literatura, pacientes com HLGR permaneceram mais tempo hospitalizados antes do isolamento de enterococo no sangue, quando comparados a pacientes sem HLGR (Antalek et al., 1995; Wells et al., 1992; Zervos et al., 1986). Em estudos anteriores, os pacientes desenvolveram ICS por HLGR entre 20 a 40 dias após hospitalização (Antalek et al., 1995; Wells et al., 1992; Zervos et al., 1986). Concluímos que no HC-Unicamp os pacientes desenvolvem ICS por *E. faecalis* HLGR mais precocemente, isso pode ser resultado da transferência de plasmídeos que conferem HLGR e seleção de isolados resistentes mais precoce. Ressaltamos a importância de medidas de prevenção na transmissão de enterococo e a importância de avaliar-se a possibilidade de infecção enterocócica em pacientes com ICS e tempo de internação de duas semanas no HC-Unicamp.

A presença de CVD, através de análise univariada, foi associada com ICS por HLGR. Gross et al. (1976) descreveram pacientes colonizados por enterococos no reto, subsequentemente períneo e trato urinário, seguindo a inserção e trajeto de cateter urinário. Possivelmente, pacientes com CVD, no início, são colonizados por *E. faecalis* HLGR, como demonstrado pelo estudo de Zervos et al. (1986), e a presença de cateter urinário representa fator de risco para o desenvolvimento de infecção. Segundo o estudo de

Noskin et al. (1991), pacientes em que barreiras protetoras naturais foram rompidas por cateteres ou úlceras, o risco de desenvolvimento de ICS por enterococo foi maior a partir das portas de entrada presentes. Por isso, é importante evitar a cateterização urinária prolongada e, quando necessária, a remoção do cateter deve ser o mais precoce possível.

A associação entre *E. faecalis* HLGR e presença de co-morbidade é controversa. Em nosso estudo, a presença de tumor hematológico como co-morbidade, pela análise multivariada, foi associada com ICS por *E. faecalis* HLGR. Caballero-Granado et al. (1988) encontraram associação entre insuficiência renal crônica e ICS por *E. faecalis* HLGR. Outros estudos não encontraram associação entre a presença de uma co-morbidade específica e infecção HLGR, mas a comparabilidade entre esses estudos é difícil porque não foram avaliadas as mesmas co-morbidades (Huycke et al., 1991; Noskin et al., 1991; Wells et al., 1992).

Encontramos uma associação significativa entre HLGR e resistência à ciprofloxacina, um antibiótico da classe das quinolonas. Em nosso hospital, ciprofloxacina é utilizada em pacientes com tumores hematológicos como profilaxia para infecções bacterianas. Este baixo grau de suscetibilidade de isolados de enterococos HLGR às quinolonas foi descrito previamente (Noskin et al., 1991; Balas et al., 1997; Woodford et al., 2003). O uso prévio de ciprofloxacina pode promover vantagens seletivas aos enterococos resistentes à quinolona e HLGR (Zervos et al., 1988).

Como já dissemos, HLGR é mediada pela enzima bifuncional aminoglicosídeo AAC (6')-APH(2''). O gene codificador dessa enzima pode estar associado com elementos transponíveis localizados em plasmídeos ou integrados no cromossoma. Dessa forma, as bases genéticas para HLGR podem ser transferidas entre isolados com relativa facilidade. Em contraste, a resistência às fluoroquinolonas está associada com mutações cromossômicas (Kanematsu et al., 1998; Onodera et al., 2002). Ruiz (2003) demonstrou resistência a fluoroquinolonas mediada por plasmídeo em enterobactérias, mas resistência transferível às fluoroquinolonas não foi relatada em enterococos. A resistência à ciprofloxacina entre enterococos é alta no mundo, variando de 50% a 58% em enterococos isolados no Canadá, EUA, América Latina, Europa e Ásia (Low, 2001). Taxa semelhante de resistência à

ciprofloxacina foi encontrada no nosso estudo, o que adiciona maior dificuldade ao tratamento de ICS, já que a resistência à ciprofloxacina estava associada à HLGR.

Infecção por enterococo HLGR freqüentemente é precedida por colonização e seleção de cepas resistentes. A principal força seletiva para a emergência de colonização e infecção enterocócica é atribuída ao uso de antibióticos de amplo espectro com baixa atividade contra enterococos (Wells et al., 1992; Zervos et al., 1986; Zervos et al., 1988). Antibióticos podem promover colonização e infecção por enterococos resistentes por dois mecanismos (Huycke, 1998). Primeiro, muitos antibióticos de amplo espectro possuem pouca ou nenhuma atividade anti-enterocócica e sua administração, comumente, leva a supercrescimento de enterococo nos sítios sob risco para infecção. Segundo, muitos antibióticos reduzem a resistência do trato gastrointestinal à colonização por organismos exógenos (Vollaard e Clasener, 1994). Mecanismos que evitam a colonização gastrointestinal por organismos resistentes resultam primariamente da “ação limitante” da flora anaeróbia normal e, em menor importância, da mucosa íntacta, secreção gástrica ácida e motilidade e imunidade intestinal (Vollaard e Clasener, 1994). As alterações na flora protetora intestinal, induzida por antibióticos, facilitam a colonização por patógenos exógenos como enterococos resistentes (Vollaard e Clasener, 1994).

Assim como em estudos anteriores, encontramos que o uso prévio de quinolonas, cefalosporinas, carbapenêmicos e vancomicina relacionaram-se com ICS por *E. faecalis* HLGR (Caballero-Granado et al., 1998; Noskin et al., 1991; Wells et al., 1992;). Cefalosporinas e carbapenêmicos possuem um amplo espectro antimicrobiano, mas baixa atividade contra enterococos (Auckenthaler et al., 1982; Eliopoulos et al., 1997; Fass, 1980). Estudos prévios demonstraram que infecção enterocócica HLGR está associada ao uso de cefalosporinas e colonização por enterococo HLGR (Antalek et al., 1995; Noskin et al., 1991; Wells et al., 1992; Zervos et al., 1986). Welkon et al. (1986) documentaram um aumento no número de enterococos nas fezes de pacientes tratados com imipenem.

A alta freqüência de *E. faecalis* HLGR encontrada em nosso estudo pode ser consequência da pressão seletiva exercida por antimicrobiano que, ao selecionar flora, permitem ao enterococo colonizar e causar infecção. Observamos que terapia prévia com

agentes antimicrobianos de qualquer classe apresentou associação estatística limítrofe com ICS por HLGR. O uso prévio de antimicrobianos como fator de risco para infecção HLGR permanece controverso. Alguns estudos encontraram que terapia antimicrobiana prévia foi fator de risco para infecção HLGR e outros não (Antalek et al., 1995; Viaggapan e Holliman, 1999; Wells et al., 1992; Zervos et al., 1986). Provavelmente, o risco para desenvolvimento de ICS por *E. faecalis* não esteja relacionado ao uso em geral de antimicrobianos, mas sim a algumas classes específicas que selecionam a flora e, por influência de outros fatores, desenvolvem infecção.

Enterococos também podem exibir tolerância à vancomicina (Murray, 1998; Saribas e Bagdatli, 2004). Tolerância pode ser definida como a habilidade da bactéria em não sofrer bacteriólise na presença do antimicrobiano. Nesses casos, pela ausência de lise bacteriana a ação do antibiótico acontece após período prolongado (24 horas ou mais) de exposição ao antibiótico, ao contrário do que ocorre com germes sem tolerância, nos quais esse efeito é rápido (minutos a horas). Saribas e Bagdatli (2004) estudaram 100 isolados de enterococos e encontraram 100% de tolerância à vancomicina em cepas suscetíveis a esse agente e recomendam a associação de um aminoglicosídeo à vancomicina para tratamento de infecções enterocócicas graves. Dessa forma, enterococos, por apresentarem tolerância à vancomicina, podem causar infecção em pacientes com terapia prévia com esse antibiótico por pressão seletiva, uma vez que este agente pode alterar a flora do paciente, eliminando outras bactérias como *S. aureus* e estafilococos coagulase negativa. Currie e Lemos-Filho (2004) demonstraram excreção biliar e nível detectável de vancomicina nas fezes de pacientes em uso endovenoso deste antimicrobiano, o que pode resultar em alterações da flora intestinal anaeróbia.

Já foi sugerido que a internação hospitalar por si só representa risco de colonização por bactérias do ambiente hospitalar. Dessa forma, alguns pacientes colonizam-se com *E. faecalis* HLGR e a presença ou ausência de alguns fatores influenciam para o desenvolvimento ou não de ICS por HLGR. Por exemplo, um paciente com linfoma recebe quimioterapia e, durante a internação, é colonizado por *E. faecalis* HLGR, utiliza quinolona como profilaxia para infecção e é submetido a dispositivos invasivos como cateter venoso central e urinário. Esses fatores associados podem favorecer

o desenvolvimento de ICS por *E. faecalis* HLGR, pois a quinolona promove pressão seletiva e a presença de catéter venoso e urinário são portas de entrada para ICS.

Esses achados reforçam a necessidade de controle do uso de terapia antimicrobiana em hospitais; particularmente, o uso de quinolonas, cefalosporinas e vancomicina; para, dessa forma, reduzir as chances de desenvolvimento de infecção por *E. faecalis* HLGR. Programas de uso racional de antimicrobianos mostraram-se efetivos na redução da colonização intestinal por enterococos resistentes (Quale et al, 1996).

Estudos prévios demonstraram que muitos isolados HLGR, 41% a 82%, são também altamente resistentes à estreptomicina (Antalek et al., 1995; Mcnamara et al., 1995; Caballero-Granado et al., 1998). No HC-Unicamp, encontramos aproximadamente 28% dos isolados com alto nível de resistência à estreptomicina, taxa inferior àquela encontrada para HLGR e, somente 15% dos isolados exibiam alto nível de resistência à estreptomicina e gentamicina simultaneamente. Além disso, HLGR não foi associado a alto nível de resistência à estreptomicina, portanto a utilização de estreptomicina associada à ampicilina pode ser uma opção terapêutica em nosso meio para ICS por *E. faecalis* HLGR. O uso desse aminoglicosídeo pode estar contra-indicado em determinadas populações, como pacientes idosos, com insuficiência renal e naqueles alérgicos a esse antimicrobiano.

E. faecalis resistente à ampicilina, a droga de escolha para tratamento de infecção enterocócica, foi raro no HC-Unicamp. Esse padrão de resistência encontrada por nós assemelha-se àquele encontrado por outros autores que descreveram baixa frequência de resistência em isolados da América Latina e Europa, 84% a 99% de suscetíveis (Low et al., 2001). A taxa de suscetibilidade em isolados dos Estados Unidos e Canadá foi menor, 76% (Low et al., 2001). No Brasil, Titze-de-Almeida et al. (2004) encontraram 12% de resistência à ampicilina entre *E. faecalis* isolados em uma UTI. Nenhum dos isolados de *E. faecalis* em sangue, durante o período estudado, eram resistentes à vancomicina. No HC-Unicamp, a dificuldade para tratamento de ICS por *E. faecalis* relacionava-se à resistência aos aminoglicosídeos. Vale lembrar que após o nosso estudo, em setembro de 2007, ocorreu um surto de infecção por VRE no HC-Unicamp³.

³ Comunicação pessoal da Profa. Dra. Maria Luiza Moretti, presidente da Sessão de Epidemiologia Hospitalar do HC-Unicamp.

No HC-Unicamp, em pacientes pediátricos com ICS por *E. faecalis* o tratamento empírico com ampicilina e gentamicina parece ser uma opção terapêutica, até que o antibiograma esteja disponível naqueles casos em que terapia combinada seja indicada. Por outro lado, em adultos, especialmente entre aqueles com malignidade hematológica e uso prévio de vancomicina, o sinergismo entre agente ativo na parede celular e gentamicina provavelmente foi perdido. Nesses casos, o tratamento empírico com penicilina associado à estreptomicina deve ser considerado.

Ressaltamos a importância do monitoramento da doença enterocócica invasiva em pacientes graves e triagem para HLGR e VRE. Essa prática, além de permitir tratamento adequado das referidas infecções, facilita o reconhecimento da emergência de cepas de enterococos resistentes e permite introdução de estratégias de controle.

Nosso estudo mostrou que *E. faecalis* HLGR tem um caráter endêmico no HC-Unicamp. Os resultados aqui apresentados sugerem que *E. faecalis* HLGR surgiu em algum momento do passado, disseminou-se pelo hospital, permanecendo em diversas áreas e tornou-se endêmico. Pacientes graves são particularmente sujeitos a adquirir infecção por esse agente com risco de evoluir para óbito. Uma vez que *E. faecalis* HLGR instalou-se no hospital, é pouco provável a sua eliminação. Isso ocasiona maior dificuldade na terapêutica de pacientes graves. Esse fato nos chama a atenção pela possibilidade de que os eventos observados com *E. faecalis* HLGR se repitam em relação aos VREs. Ressaltamos a importância da detecção precoce e controle de infecções por VRE no HC-Unicamp, porque após a disseminação deste pelo hospital, o controle torna-se mais difícil.

No Brasil, publicações descreveram presença de HLGR em isolados de *E. faecalis* resistentes à vancomicina e outros estudos demonstraram que os fatores de risco para aquisição de *E. faecalis* HLGR são semelhantes àqueles descritos para VRE (Edmond et al., 1996; Peset et al., 2000; Reis et al., 2001; Zanella et al., 2003). Conhecer a epidemiologia das infecções por HLGR pode auxiliar no tratamento de paciente com infecção por *E. faecalis*, controle da disseminação de isolados HLGR e, por fim, na prevenção do surgimento e controle de infecções por VRE.

Um programa para controle de enterococo resistente de sucesso, seja HLGR, seja VRE, requer vigilância passiva e ativa para identificar pacientes colonizados e infectados, adesão rigorosa às práticas de isolamento de contato pelos profissionais de saúde, descontaminação das áreas de contato, uso criterioso de vancomicina e outros antibióticos de amplo espectro (Huycke et al., 1998). Para alcançar esses objetivos há necessidade de implementação de medidas de educação, administrativas e supervisão de profissionais da saúde.

6- CONCLUSÕES

- Os pacientes com ICS por *E. faecalis* no HC-Unicamp são jovens, doentes graves, com uso freqüente de dispositivos invasivos, realização de procedimentos invasivos e antibioticoterapia;
- A prevalência de HLGR no HC-Unicamp (45,5%) é intermediária em relação aquela relatada na literatura e não foi identificado resistência à vancomicina;
- A letalidade (46,2%) dos pacientes com ICS por *E. faecalis* no HC-Unicamp é alta e assemelha-se a dados mundiais;
- ICS por HLGR está associada com a idade mais avançada, presença de tumor hematológico e uso prévio de vancomicina;
- Evolução para óbito associa-se com variáveis relacionadas a gravidade do paciente;
- Isolados de *E. faecalis* em sangue no HC-Unicamp possuem grande variabilidade genética.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beezhold DW, Slaughter S, Hayden M.K, Matushek K M, Nathan C, Trenholme GM, et al. Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. Clin Infect Dis 1997; 24 (4): 704-6.

Berk SL, Verghese A, Holtsclaw SA, Smith JK. Enterococcal pneumonia. Occurrence in patients receiving broad-spectrum antibiotic regimens and enteral feeding. Am J Med 1983; 74 (1): 153-4.

Bingen E. Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a pediatric hospital. Infect Control Epidemiol 1994; 15 (7): 488-93.

Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK, van Voohis J, Nathan C et al. The role of “colonization pressure” in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. Arch Intern Med 1998; May 25;158(10):1127-32.

Bosley GS, Facklam RR, Grossman D. Rapid identification of enterococci. J Clin Microbiol 1983; 18 (5): 1275-7.

Caballero-Granado FJ, Cisneros JM, Luque R, Torres-Tortosa M, Gamboa F, Díez F, et al. Comparative study of bacteremias caused by *Enterococcus spp.* with and without high-level resistance to gentamicin. J Clin Microbiol 1998; 36 (2): 520-25.

Caraccio MBB, Caiado CV, Bernal SBB, Falcão MJE. Microorganismos isolados em culturas em hospital secundário de 200 leitos de Campinas, SP. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1995; 28 (supl 1): 263.

Cardoso FLL, Gazineo JLD, Teixeira LM, Alves EM, Bastos VLM, Ferreira RMC. Resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e resistência à ampicilina em amostras de enterococos isolados de material clínico. In: Programa Científico do V Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar; 1996; Rio de Janeiro, Resumo nº 163, p.82.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. MMWR 1993; 42 (30): 597-9.

Cereda R, Pignatari AC, Hashimoto A, Sader H. In vitro antimicrobial activity against Enterococci isolated in a University Hospital in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997; 1 (2): 83-90.

Charlson ME, Pompei P, Ales KL, Mackenzie R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40 (5): 373-83.

Chenoweth C, Schaberg D. The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 80-9.

Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vasquez JA, Donabedian SM, Clewell DB et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 (11): 2474-7.

Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* 2000; 31 (2): 586-9.

Christie C, Hammond J, Reising S, Evans-Patterson J. Clinical and molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in a pediatric teaching hospital. *J Pediatr* 1994; 125 (3): 392-9.

Cooper GS, Havlir DS, Shlaes DM, Salata R.A. Polymicrobial bacteremia in the late 1980s: predictors of outcome and review of the literature. *Medicine* 1990; 69(2): 114-23.

Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community based persons. *J Infect Dis* 1995, 171 (5): 1223-9.

Coudron PE, Mayhall CG, Facklan RR, Spadora AC, Lamb VA, Lybrand MR, et al. *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1984; 20 (6): 1044-8.

Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004; 53 (1): 13-20.

Currie BP, Lemos-Filho L. Evidence for biliary excretion of vancomycin into stool during intravenous therapy: potential implications for rectal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48 (11): 4427-9.

Depardieu F, Kolbert M, Pruul H, Bell J, Courvalin P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (10): 3892-904.

DiazGranados CA, Zimmer SM, Klein M, Jernigan JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (3): 327-33.

Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int JAntimicrob Agents* 2002; 20 (6): 412-8.

Diekema DJ, Beekmannn SE, Chapin KC, Morel KA, Munson E.; Doern GV. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (8): 3655-60.

Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, Weinbaum DL, Wenzel RP. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: Natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1996; 23 (6): 1234-9.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999; 29 (2): 239-44.

Eliopoulos GM. Vancomycin-resistant enterococci. Mechanism and clinical relevance. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11 (4): 851-65.

Facklam R; Sahm DA, Teixeira LM. Enterococcus. In: Murray, PR; Baron EJ; Pfaller M, Tenover FC; Tenover RH (ed) - *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, American Society for Microbiology, 1999; p. 297-305.

Fass RJ. In vitro activities of beta-lactam and aminoglycoside antibiotics. A comparative study of 20 parenterally administered drugs. Arch Intern Med 1980; 140 (6): 763-8.

Fernandez FFJ, Agruado FJ, Gonzalez MR, Fernandez SP, Fernandez AM, Germinas AN, et al. *Enterococcus faecalis* bacteremia. Rev Clin Esp 2004; 202 (5): 244-50.

Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. J Clin Microbiol 2000; 38 (6): 2108-11.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 1988; 16 (3): 128-40.

Garrison RN, Fry DE, Berberich S, Polk HC Jr. Enterococcal bacteremia: clinical implications and determinants of death. Ann Surg 1982; 196 (1): 43-7.

Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005; 41 (6): 848-54.

Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Pigott NE, Facklam RR, Cooksey RC, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. J Clin Microbiol 1992; 30 (9): 2373-8.

Graham JC e Gould FK. Role of aminoglycoside in the treatment of bacterial endocarditis. J Antimicrob Chemother 2002; 49 (3): 437-44.

Graninger W, Ragette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. Clin Infect Dis 1992; 15 (1): 49-57.

Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur Microbiol 1986; 137B (2): 165-75.

Gross PA, Harkavy LM, Barden GE, Flower MF. The epidemiology of nosocomial enterococcal urinary tract infection. Am J Med Sci 1976; 272 (1): 75-81.

Gullberg RM, Homann SR, Phair JP. Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. Rev Infect Dis 1989; 11 (1): 74-85.

Handweger S, Raucher B, Altarac D, Monka J, Marchione S, Singh KV, et al. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin. Clin Infect Dis 1993; 16 (6): 750-5.

Hoffmann SA, Moellering RC Jr. The enterococcus: “putting the bug in our ears”. Ann Intern Med 1987; 106 (5): 757-61.

Hoge CW, Adams J, Buchanan B, Sears SD. Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal. Rev Infect Dis 1991; 13 (4): 600-5.

Horodniceanu T, Bougueleret L, El-Solh N, Bieth G, Delbos F. High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. Zymogenes. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16 (5): 686-9.

Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35 (8): 1626-34.

Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis 1998; 4 (2): 239-49.

Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. Infect Immun 1984; 45 (2): 528-30.

Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. J Clin Microbiol 1987; 25 (8): 1524-8.

Johnson AP. The pathogenicity of enterococci. J Antimicrob Chemother 1994; 33 (6): 1083-9.

Jones RN. Gram-positive superinfections following beta-lactam chemotherapy: the significance of *Enterococcus*. Infection 1985; 13 (suppl.1): S81-8.

Jones RN, Marshall SA, Pfaller MA, Wilke WW, Hollis RJ, Erwin M E, et al. Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29 (2): 95-102.

Kanematsu E, Deguchi T, Yasuda M, Kawanura T, Nishino Y, Kawada M. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 433-5.

Kania I, Gospodarek E, Ulatowska B. Analysis of the bacterial strains isolated from urine samples of hospitalized and ambulatory patients. *Med Sci Monit* 2000; 6 (6): 1122-7.

Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Volturo GA. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 10; 3: 7.

Kaye D. Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Arch Intern Med* 1982; 142 (11): 2006-9.

Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992; 60 (1): 25-30.

Landman D, Quale JM. Management of infections due to resistance enterococci: a review of therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40 (2): 161-70.

Landry SL, Kaiser DL, Wenzel RP. Hospital stay and mortality attributed to nosocomial enterococcal bacteremia: a controlled study. *Am J Infect Control* 1989; 17 (6): 323-9.

Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A, Keane CT. Incidence and detection of multi-drug-resistant enterococci in Dublin hospitals. *J Med Microbiol* 1997; 46 (2): 150-6.

Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (4): 545-54.

Lerma FA, Palomar M, Insausti J, Olaechea P, Alcalá MA, Blanco A. Infección por enterococo en pacientes críticos ingresados en la UCI. *Med Clin (Barc)* 2003; 121 (8): 281-6.

Linden PK, Pasculle AW, Manez R, Kramer DJ, Fung JJ, Pinna AD, et al. Differences in outcomes for patients bacteremia due vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. *Clin Infect Dis* 1996; 22 (4): 663-70.

Low ED, Keller N, Barth A, Jones R N. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the Sentry Antimicrobial surveillance program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl. 2): S133-45.

Macedo de Oliveira A. Amplificação da região 16S-23S do RNA ribossomal de *Staphylococcus aureus* e sua aplicação no estudo das infecções hospitalares [Tese-Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2001.

Maki DG, Agger WA. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management. Medicine 1988; 67 (4): 248-69.

Malone DA, Wagner RA, Myers JP, Watanakunakorn C. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals. Am J Med 1986; 81 (4): 601-6.

McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health implications-care setting : prevalence, sources, and public health implications. Emerg Infect Dis 1997; 3 (3): 311-7.

McNamara EB, King EM, Smyth EG. A survey of antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus* spp. from Irish hospitals. J Antimicrob Chemother 1995; 35 (1): 185-9.

Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-resistance to gentamicin in clinical of enterococci. J Infect Dis 1983; 147 (4):751-7.

Megran DW. Enterococcal endocarditis. Clin Infect Dis 1992; 15 (1): 63-71.

Moellering RC Jr, Wennersten C, Weinberg AN. Studies on antibiotic against enterococci. I. Bacteriologic studies. J Lab Clin Med 1971; 77 (5): 821-8.

Moellering RC Jr. The enterococcus: A classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. J Antimicrob Chemother 1991; 28; 1-12.

Moellering, RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis 1992; 14 (6): 1173-6.

Moellering RC Jr. Quinupristin/dalfopristin: therapeutic potential for vancomycin-resistant enterococcal infections. J Antimicrob Chemother 1999; 44 (Suppl A): 25-30.

Moellering RC Jr. Enterococcus species, Streptococcus bovis, and Leuconostoc species. In: Mandell GL, Bennet J., Dolin R., eds. Principles and practice of infectious disease. New York: Churchill Livingstone, 2000.

Moretti ML, Bratfich OJ, Stucchi RB, Levi C, Levi AS, Duboc GM. Clonal dissemination of VanA-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospital of two cities located 100 Km apart. Braz J Med Biol Res 2004; 37 (9): 1139-43.

Morrison AJ Jr, Wenzel RP. Nosocomial urinary tract infections due to enterococcus. Ten years' experience at a university hospital. Arch Intern Med 1986; 146 (8): 1549-51.

Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 13 (4): 513-22.

Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern GV. Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. J Clin Microbiol 2003; 41 (1): 495-7.

Murray BE, Church DA, Wanger A, Zcheck K, Levison ME, Ingerman MJ, et al. Comparison of two beta-lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30 (6): 861-4.

Murray BE. The life and times of the Enterococcus. Clin Microb Rev 1990; 3 (1): 46-65.

Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition site. J Clin Microbiol 1990, 28 (9): 2059-63.

Murray BE, Singh KV, Markowitz SM, Lopardo HA, Paterisson JE, Zervps MJ, et al. Evidence for clonal spread of a single strain of beta-lactamase producing Enterococcus (*Streptococcus*) faecalis to six hospitals in five states. J Infect Dis 1991; 163 (4): 780-5.

Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 1998; 4 (1): 37-47.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 7 ed. Washington, American Society of Microbiology Press 1999.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, M7-A3. 1993. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA

Noskin GA, Till M, Patterson BK, Clarke JT, Warren JR. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* bacteremia. J Infect Dis 1991, 164 (4): 1212-5.

Noskin GA, Peterson LR, Warren JR. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bacteremia: acquisition and outcome. Clin Infect Dis 1995; 20 (2): 296-301.

Nys S, Bruinsman J, Filius PMG, Van Den Bogaard AE, Hoffman L, Terpoten PHW, et al. Effect of hospitalization on the antibiotic resistance of fecal *Enterococcus faecalis* of surgical patients over time. Microbiol Drug Resist 2005; 11 (2): 154-8.

Onodera Y, Okuda J, Tanaka M, Sato K. Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46 (6): 1800-4.

Palavecino ER. Puesta al día en enterococos – año 2001: Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. Rev Chil Infect 2001; 18 (2): 95-100.

Papaparaskivas J, Vatsopoulos A, Tassios PT, Avlami A, Legakis NJ, Kalapothreski V. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother 2000, 45 (3): 277-83.

Patterson JE, Colodny SM, Zervos MJ. Serious infection due to beta-lactamase-producing *Streptococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin. J Infect Dis 1988; 158 (5): 1144-5.

Patterson JE, Wanger A, Zscheck KK, Zervos MJ, Murray BE. Molecular epidemiology of beta-lactamase-producing enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34 (2): 302-5.

Patterson JE, Sweeney AH, Simms MD, Carley N, Mangi R, Sabetta J, et al. An analysis of 110 serious enterococcal infections epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. Medicine 1995; 74 (4): 191-200.

Peset V, Tallón P, Sola T, Sánchez E, Sarrión A, Pérez-Bellés C, et al. Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19 (10): 742-9.

Pournaras S, Tsakris A, Kaufmann ME, Douboyas J, Antoniadis A. Outbreak of infections in a Greek university hospital a single clone of high-level aminoglycoside *Enterococcus faecalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21 (12): 786-9.

Quale J, Landman D, Saurina G, Atwood E, Ditore V, Patel K. Manipulation of a hospital antimicrobial formulary to control an outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 1996; 23 (5): 1020-5.

Raycroft RE, Zimmerman LN. New mode of genetic transfer in *Streptococcus faecalis* var. *Liquefaciens*. *J Bacteriol* 1964; 87: 799-801.

Reis AO, Cordeiro JC, Machado AM, Sader HS. In vitro antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. *Braz J Infect Dis* 2001; 5 (5):243-51.

Reuben AG, Musher DM, Hamill RJ, Broucke J. Polymicrobial bacteremia: clinical and microbiologic patterns. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (2): 161-83.

Rhinehart E, Smith N E, Wennersten C, Gorss E, Freeman J, Eliopoulos G. M, et al. Rapid dissemination of beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant-toddler surgical ward. *N Engl J Méd* 1990; 323 (26): 1814-8.

Ribas RM, Gontijo PP. Avaliação da presença de *Enterococcus* (ENT) resistente à vancomicina (VAN) em pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. In: Resumos do VI Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Campos do Jordão 1998; Pôster nº 58, p. 149.

Routsi C, Platsouka E, Paniara O, Dimitriadou E, Saroglou G, Roussos C et al. Enterococcal infections in a Greek intensive care unit: a 5-y study. *Scand J Infect Dis* 2000; 32 (3): 275-80.

- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 (5): 1109-17.
- Ruoff KL, De La Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro M.J. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (3): 435-37.
- Sader HS, Sampaio JLM, Zoccoli C, Jones RN. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three brazilian medical centers. *Braz J Infect Dis* 1999; 3 (2): 63-79.
- Sader HS, Streit JM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacterial isolates from European medical centres: results of the daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (9): 844-52.
- Saeedi B, Hallgren A, Isaksson B, Jonasson J, Nilsson LE, Hanberger H. Genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin resistance from patients with bacteremia in the south east of Sweden. *Scand J Infect Dis* 2004; 36 (6-7): 405-9.
- Saribas S, Bagdatli Y. Vancomycin tolerance in enterococci. *Chemotherapy* 2004; 50 (5): 250-4.
- Schaberg DR. Major trends in microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; 91 (16) (Suppl 3B): 72S-5S.
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984; 34: 31-4.
- Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JAA. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 (10): 2542-6.
- Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001; 69 (7): 4366-72.

Siegman-Igra Y, Schwartz D, Konforti N. Polymicrobial bacteremia. *Med Microbiol Immunol* 1988; 177 (3): 169-79.

Silverman J, Thal La, Perri MB, Bostic G, Zervos MG. Epidemiologic evaluation of antimicrobial resistance in community-acquired enterococci. *J Clin Microbiol* 1998, 36 (3): 830-2.

Simonsen GS, Smabrekek L, Monnet DL, Sorensen TL, Moller JK, Kristinsson KG, et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 (2): 323-31.

Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Lonks JR, Boyce JM. Comparative in vitro activities of daptomycin and vancomycin against resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (12): 3447-50.

Starling GE, Couto BR, Pinheiro SM. Applying the Center for Diseases Control and Prevention and National Nosocomial Surveillance system methods in Brazilian hospitals. *Am J Infect Control* 1997; 25(4): 303-11.

Stone HH, Kolb LD, Currie CA, Geheber CE, Cuzzell JZ. Candida sepsis: pathogenesis and principles of treatment. *Ann Surg* 1974; 179 (5): 697-711.

Teixeira LM, Facklam RR. *Enterococcus*, p. 422-433. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2003.

Tenover FC, Arbeit R, Goering R, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (9): 2233-39.

Tenover FC, Arbeit R, Goering R. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18 (6) 426-39.

Titze-de-Almeida R, Rollo Filho M, Silveira CAN, Rodrigues IP, Eudes Filho J, Nascimento RS, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. *Braz J Infect Dis* 2004; 8 (3): 197-205.

Uttley AH, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, et al. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol Infect* 1989; 103 (1): 173-81.

van Den Braak N, Van Belkum A, Kreft D, Tewitt R.; Verbrugh HA, Endtz HP. The prevalence and clonal expansion of high-level gentamicin-resistant enterococci isolated from blood cultures in a Dutch university hospital. *J Antimicrob Chemotherapy* 1999; 44 (6): 795-8.

Vemuri RK, Zervos MJ. Enterococcal infections. The increasing threat of nosocomial spread and drug resistance. *Postgrad Med* 1993; 93 (3): 121-8.

Venditi M, Tarasi A, Comandini UV, Gentile G, Girmenia C, Micozzi A, et al. Enterococcal septicemia in patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12 (4): 241-7.

Vergis EN, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, et al. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. A prospective multicenter study. *Ann Intern Med* 2001; 135 (7): 484-92.

Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, et al. Association between the presence of Enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* 2002; 35 (5): 570-5.

Viaggapan M e Holliman RE. Risk factors for acquisition of gentamicin-resistant enterococcal infection: a case-controlled study. *Postgrad Med J* 1999; 75 (884): 342-5.

Vollaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38 (3): 409-14.

Watanakunakorn C, Patel R. Comparison of patients with enterococcal bacteremia due to strains with and without high-level resistance to gentamicin. Clin Infect Dis 1993; 17 (1): 74-8.

Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990's: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997; 24 (4): 584-602.

Welton CJ, Long SS, Gilligan PH. Effect of imipenem-cilastatin therapy on fecal flora. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29 (5): 741-3.

Wells LD, von Graevenitz A. Clinical significance of enterococci in blood cultures from adult patients. Infection 1980; 8 (4): 147-51.

Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. Rev Infect Dis 1988; 10 (5): 958-79.

Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. J Infect Dis 1990; 162 (1): 82-90.

Wells CL, Wong ES, Murray BE, Coudron PE, Williams DS, Markowitz SM. Infection due to beta-lactamase producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Ann Intern Med 1992; 116 (4): 285-92.

Wells CL, Juni BA, Cameron SB, Mason KR, Dunn DL, Ferrieri P, et al. Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. Clin Infect Dis 1995; 21 (1): 45-50.

Wenzel RP, Edmond MB. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. Emerg Infect Dis 2001; 7 (2): 174-7.

Whiteside M, Moore J, Ratzan K. An investigation of enterococcal bacteremia. Am J Infect Control 1983; 11 (4): 125-9.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39 (3): 309-17.

Woodford N, Reynolds R, Turton J, Scott F, Sinclair A, Williams A, et al. Two widely disseminated strains of *Enterococcus faecalis* highly resistant to gentamicin and ciprofloxacin from bacteremias in the UK and Ireland. J Antimicrobial Chemother 2003; 52 (4): 711-4.

Xinghua MA, Michiaki K, Takahashi A, Tanimoto K, Ike Y. Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. J Clin Microbiol 1998; 36 (9): 2460-4.

Zanella RC, Brandileone MC, Bokermann S, Almeida SC, Valdetaro F, Vitorio F, et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. Microb Drug Resist 2003; 9 (3): 283-91.

Zarrilli R, Tripodi MF, Di Popolo A, Fortunato R, Bagattini M, Crispino M. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. J Antimicrob Chemother 2005, 56 (5): 827-35.

Zervos MJ, Dembinski S, Mikisell T, Schaberg DR. High-level resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis*: risk factors and evidence, for exogenous acquisition of infection. J Infectious Dis 1986; 153 (6): 1075-83.

Zervos MJ, Terpenning NS, Schaberg DR, Therasse PM, Medendorp SV, Kauffman CA. High-level aminoglycoside-resistant enterococci. Colonization of nursing home and acute care hospital patients. Arch Intern Med 1987a; 147 (9): 1591-4.

Zervos MJ, Kauffman CA, Therasse PM, Bergman AG, Mikesell TS, Schaberg DR. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis*. An epidemiologic study. Ann Intern Med 1987b; 106 (5): 687-91.

Zervos MJ, Bacon AE, Patterson JE, Schaberg DR, Kauffman CA. Enterococcal superinfection in patients treated with ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother 1988; 21 (1): 113-5.

**8- APRESENTAÇÕES ORIGINADAS
POR ESTA TESE DE DOUTORADO**

Vigani AG, Macedo de Oliveira A, Stucchi RSB, Moretti ML. Comparative study of bacteremias caused by *Enterococcus faecalis* with and without high-level resistance to gentamicin. 12th International Congress on Infectious Diseases. Lisboa, Portugal, 15 a 18 de junho, 2006. Poster Abstracts 3.018.

Vigani AG, Macedo de Oliveira A, Stucchi RSB, Moretti ML. Bacteremias por *Enterococcus faecalis* e fatores de risco para óbito. Apresentação oral por Vigani AG no 5º Congresso Paulista de Infectologia. Campinas, SP, 23 a 26 de agosto, 2006.

Vigani AG, Macedo de Oliveira A, Stucchi RSB, Moretti ML. Estudo comparativo de bacteremias por *Enterococcus faecalis* com e sem alto-nível de resistência à gentamicina. VI Congresso Pan-Americano e X Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia hospitalar. Porto Alegre, RS, 11 a 15 de setembro, 2006.

Vigani AG, Macedo de Oliveira A, Bratfich OJ, Stucchi RSB, Moretti ML. Bacteremia caused by *Enterococcus faecalis* and the impact of high-level gentamicin resistance. Aceito para publicação em 8 de setembro de 2008 ao Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Clinical, epidemiological, and microbiological characteristics of bacteremia caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*

A.G. Vigani, A. Macedo de Oliveira, O.J. Bratfich, R.S.B. Stucchi and M.L. Moretti

Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Correspondence to: M.L. Moretti, Departamento de Clínica Médica, Hospital de Clínicas, Unicamp, Caixa Postal 6198, 13083-970 Campinas, SP, Brasil
Fax +55-19-3289-4107. E-mail: moretti@hc.unicamp.br

Enterococcus spp bacteremia is associated with high mortality and the appearance of high-level gentamicin resistance (HLGR) created additional challenges for the treatment of these infections. We evaluated the epidemiological and clinical characteristics of patients with bacteremias caused by HLGR and non-HLGR *Enterococcus faecalis* isolates at a teaching hospital in the State of São Paulo, Brazil. Patients with bacteremia due to *E. faecalis* diagnosed between January 1999 and December 2003 were included in the study. We collected clinical, epidemiological, and microbiological data from medical records. Banked isolates were typed using pulsed-field gel electrophoresis. We identified 145 cases of *E. faecalis* bacteremia: 66 (45.5%) were caused by HLGR isolates and 79 (54.5%) by non-HLGR. In the univariate analysis, patients with HLGR infection were older, had higher rates of bladder catheterization, and more often had treatment with cephalosporin, quinolone, and/or carbapenem compared with patients with non-HLGR infection ($P < 0.05$). Multivariate analysis indicated that older age, hematological malignancy, and previous use of vancomycin were independently associated with HLGR ($P < 0.05$). Mortality rates were not significantly different among patients with HLGR (50%) and non-HLGR (43%) infections ($P = 0.40$). Of the 32 genotyped isolates, 16 were distributed into 6 main electrophoresis patterns and 16 others had distinct patterns. *E. faecalis* bacteremia is associated with high mortality and is frequently caused by HLGR isolates at this teaching hospital. The variability among genotyped isolates suggests that endogenous infections, rather than patient-to-patient transmission of *E. faecalis*, are more common at this institution.

Key words: *Enterococcus faecalis*; Bacteremia; High-level gentamicin resistance; Infection control; *Enterococcus faecalis* genotyping

Publication supported by FAPESP.

Received November 8, 2007. Accepted October 17, 2008

Introduction

Enterococcus spp is the third most frequent cause of hospital-acquired bacteremia, accounting for 8% of all nosocomial bacteremias in the United States (1). High-level gentamicin resistance (HLGR) has emerged among *Enterococcus* spp over the last two decades, and is associated with the loss of synergy between cell-active antibiotics (e.g., vancomycin and penicillin, particularly ampicillin)

and most aminoglycosides (e.g., gentamicin, tobramycin, amikacin, and kanamycin), thus posing additional treatment challenges (2).

Enterococcal bacteremia is associated with high mortality, which is even further increased when caused by HLGR strains compared with those caused by non-HLGR strains (3-5). In Brazil, clinical and epidemiological studies of enterococcal infections have been less comprehensive, with most studies focusing on vancomycin-resistant *En-*

terococcus (VRE), which is still restricted to a few Brazilian hospitals (6-8).

Since *Enterococcus* spp is the second most common cause of Gram-positive blood stream infections in Brazil and that approximately 76% of all enterococcal infections are due to *Enterococcus faecalis*, we evaluated cases of bacteremia caused by this organism at the teaching hospital of the Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo State (8). Our objective was to characterize the epidemiological, clinical, and microbiological features of bacteremias caused by HLGR and non-HLGR *E. faecalis* isolated from January 1999 through December 2003. This evaluation could help identify measures to reduce the frequency of these infections, especially when caused by HLGR bacteria.

Patients and Methods

Hospital setting

The teaching hospital of Unicamp is a 403-bed, tertiary-care hospital that serves an estimated population of 5 million people. During the study period, there were approximately 14,000 admissions per year.

Study population

Patients with *E. faecalis* bacteremia were identified through a review of blood-culture records at the hospital microbiology laboratory. In accordance with current guidelines, *E. faecalis* bacteremia was defined as at least one positive blood culture for this pathogen (9). In patients with multiple episodes of bacteremia, only the first episode was considered for inclusion in this study.

Study design

We reviewed patient medical records using standard forms and collected data on potential risk factors for enterococcal infections. These included epidemiological and clinical information (age, gender, hospitalization ward, primary diagnosis, underlying chronic diseases, and severity of disease) and microbiological data (monomicrobial or polymicrobial etiology and antimicrobial susceptibility of *E. faecalis*). The severity of disease was estimated using the Charlson score (10). Invasive procedures prior to bacteremia onset, such as surgery, urinary bladder catheterization, mechanical ventilation, central venous catheterization, and administration of antimicrobials prior to the identification of *E. faecalis*, were also recorded.

Definitions

Community-acquired *E. faecalis* bacteremia was defined as a positive blood culture drawn <72 h from patient

admission or evidence of infection at the time of admission. Nosocomial *E. faecalis* bacteremia, conversely, was defined as a positive blood culture drawn ≥ 72 h after admission and absence of any evidence of infection at admission.

Identification and antimicrobial susceptibility testing

Enterococcus species and antimicrobial susceptibility were determined using the Gram-Positive Identification Card® and Gram-Positive Susceptibility Card®, respectively (bioMérieux Vitek®, Marcy l'Étoile, France). A minimum inhibitory concentration of 500 µg/mL was used as the cut-off value for HLGR according to manufacturer guidelines.

Genotyping

DNA was extracted as described previously (11). Purified DNA was digested with the restriction enzyme *Sma*I and products were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) on 1.0% agarose gels using CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, USA). Pulse time was increased from 5 to 35 s, at 6.0 V/cm for 20 h at 14°C. Gel images were captured and analyzed using autoradiographic images from IS-1000 digital imaging system (Bio-Capt MW, version 99, M&S Instruments Trading Inc., France). We estimated the relationship among the isolates using the Dice coefficient (Biogene software, Vilbert-Loumar, France). Isolates with similarity <85% by PFGE were considered to be genetically unrelated, while similarity of $\geq 85\%$ was considered evidence of isolates belonging to the same PFGE subtype (12). PFGE profiles were identified by capital letters.

Statistical analysis

Univariate analysis was performed using logistic regression, and the Fisher exact and Mann-Whitney tests, when appropriate. Variables for which an association with HLGR was suspected (i.e., P value ≤ 0.20) were included in a multivariate stepwise logistic regression model. We considered the P value < 0.05 to be statistically significant.

Results

A total of 145 cases of bacteremia caused by *E. faecalis* were identified: 66 (45.5%) were HLGR and 79 (54.5%) non-HLGR. Cases of nosocomial bacteremia numbered 115 (80%). Polymicrobial bacteremia was present in 70 (48.3%) cases and Gram-negative bacilli were isolated in 42 (60%) of those.

Gender distribution was similar in patients with HLGR and non-HLGR infections (Table 1). In addition, patients with HLGR were older than patients without HLGR, median

age of 48.5 years (range: 10-81 years) versus 38 years (range: 1 day-80 years), respectively ($P = 0.008$). Length of hospitalization prior to bacteremia diagnosis did not differ significantly between patients with HLGR (14 days) and non-HLGR (13 days) infection ($P = 0.47$). Among underlying chronic diseases, only hematological malignancies were significantly associated with HLGR bacteremia ($P = 0.005$; Table 1).

The association between any antimicrobial therapy and the presence of HLGR bacteremia approached statistical significance ($P = 0.06$). However, when each antimicrobial was evaluated individually, HLGR was associated with previous use of quinolone [odds ratio (OR) = 2.79, 95% confidence interval (CI) = 1.19-6.53], carbapenem [OR = 4.52, 95%CI = 1.19-17.20], and cephalosporin [OR

= 1.98, 95%CI = 1.02-3.84; Table 1].

Urinary catheterization was found to be associated significantly with HLGR bacteremia ($P = 0.02$). We were unable to show an association of other invasive procedures and HLGR bacteremia (Table 1).

Multivariate stepwise logistic regression analysis showed that age (at 10-year intervals; adjusted OR = 1.33, 95%CI = 1.13-1.57), hematological malignancies (adjusted OR = 4.92, 95%CI = 1.82-13.27), and previous use of vancomycin (adjusted OR = 3.93, 95%CI = 1.06-14.52) were each associated independently with HLGR infection.

Of the 145 patients, 67 (46.2%) died during hospitalization. Bacteremia by HLGR isolates did not influence patient outcome; 33 (50%) of 66 patients with HLGR bacteremia died versus 34 (43%) of 79 with non-HLGR bacter-

Table 1. Univariate analysis of factors associated with high-level gentamicin-resistant (HLGR) and non-HLGR *Enterococcus faecalis* bacteremia.

Variables	HLGR (N = 66)	Non-HLGR (N = 79)	OR	95%CI
Gender (male)	34 (51.5%)	44 (55.7%)	1.18	0.61-2.28
Age				
0-14 years	1 (1.5%)	24 (30.4%)		
14-64 years	49 (74.3%)	40 (50.6%)		
>65	16 (24.2%)	15 (19.0%)		
For each 10 years			1.27	1.09-1.47
Charlson score, median (range)	2 (0-6)	2 (0-9)		
At least 1 underlying diagnosis ^a	61 (92.4%)	67 (84.8%)	2.19	0.73-6.56
Hypertension	14 (21.2%)	14 (17.7%)	1.25	0.55-2.85
Solid malignancy	11 (16.7%)	14 (17.7%)	0.93	0.39-2.21
Hematological malignancy	18 (27.8%)*	7 (8.9%)	3.86	1.50-9.94
Chronic renal failure	11 (16.7%)	10 (12.6%)	1.38	0.55-3.49
Diabetes mellitus	10 (15.0%)	8 (10.1%)	1.59	0.59-4.28
Prior use of antimicrobials				
Any antimicrobial	46 (70.0%)	43 (54.4%)	1.93	0.97-3.83
Aminoglycoside	7 (10.61%)	14 (17.7%)	0.55	0.21-1.46
Carbapenem	10 (15.1%)*	3 (3.8%)	4.52	1.19-17.2
Cephalosporin	37 (56.0%)*	31 (39.2%)	1.98	1.02-3.84
Metronidazol	19 (28.8%)	14 (17.7%)	1.88	0.86-4.12
Penicillins	5 (7.60%)	13 (16.5%)	0.42	0.14-1.24
Quinolone	19 (28.8%)*	10 (12.6%)	2.79	1.19-6.53
Vancomycin	9 (13.6%)	4 (5.0%)	2.96	0.87-10.1
Others	1 (1.5%)	5 (6.3%)	0.23	0.03-2.00
Hospital procedures				
Central venous catheter	46 (69.7%)	51 (64.6%)	1.26	0.63-2.54
Urinary catheter	44 (66.7%)*	38 (48.1%)	2.16	1.10-4.24
Mechanical ventilation	22 (33.3%)	27 (34.2%)	0.96	0.48-1.92
Surgery	22 (33.3%)	25 (31.6%)	1.08	0.54-2.17
Polymicrobial bacteremia	36 (54.5%)	34 (43.0%)	1.59	0.82-3.07

Data are reported as number with percent in parentheses. ^aSome patients had more than one underlying diagnosis. * $P < 0.005$ compared to non-HLGR bacteria (univariate logistic regression).

emia ($P = 0.40$).

Evaluation of antimicrobial resistance revealed that 40 (27.6%) *E. faecalis* isolates had high-level resistance to streptomycin alone, 84 (57.9%) had high-level resistance to either gentamicin or streptomycin, and 22 (33.3%) had high-level resistance to both gentamicin and streptomycin. Resistance to ampicillin was present in 3% of isolates and was not significantly associated with HLGR ($P = 0.60$). Additionally, the prevalence of resistance to ciprofloxacin was significantly higher among HLGR than non-HLGR isolates (92.4 vs 11.4%, respectively; $P < 0.001$). Vancomycin resistance was not detected in any isolate.

Only 32 (22%) *E. faecalis* isolates were available for PFGE. We constructed a dendrogram based on PFGE results (Figure 1). Sixteen isolates were grouped in six main PFGE patterns. The remaining 16 isolates had distinct PFGE profiles. Molecular profiles D and F included HLGR *E. faecalis* isolates only, while all isolates in group E were non-HLGR. PFGE profiles A, B, and C were comprised of HLGR and non-HLGR *E. faecalis* isolates. Of the

six PFGE profiles with more than one isolate, profiles A, C, D, and F had isolates collected from patients admitted to hospital wards ≥ 30 feet apart.

Discussion

Enterococcus spp has gained importance over the last years partially due to its increase in prevalence and the emergence of multiresistant strains in the hospital setting. The prevalence of HLGR enterococcal bacteremia has been found to be between 7 and 63% in North American hospitals (5,13,14). This wide variation might be explained by differences in study designs, sources of specimens, and species considered. Previous studies of antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp in Brazil, not focused on *E. faecalis* and with samples from different sites (blood, urine, and sputum), found the prevalence of HLGR to range from 27 to 55% (6,7). In our study, the first to focus on *E. faecalis* bacteremia in Brazil, 45% of cases were due to HLGR isolates.

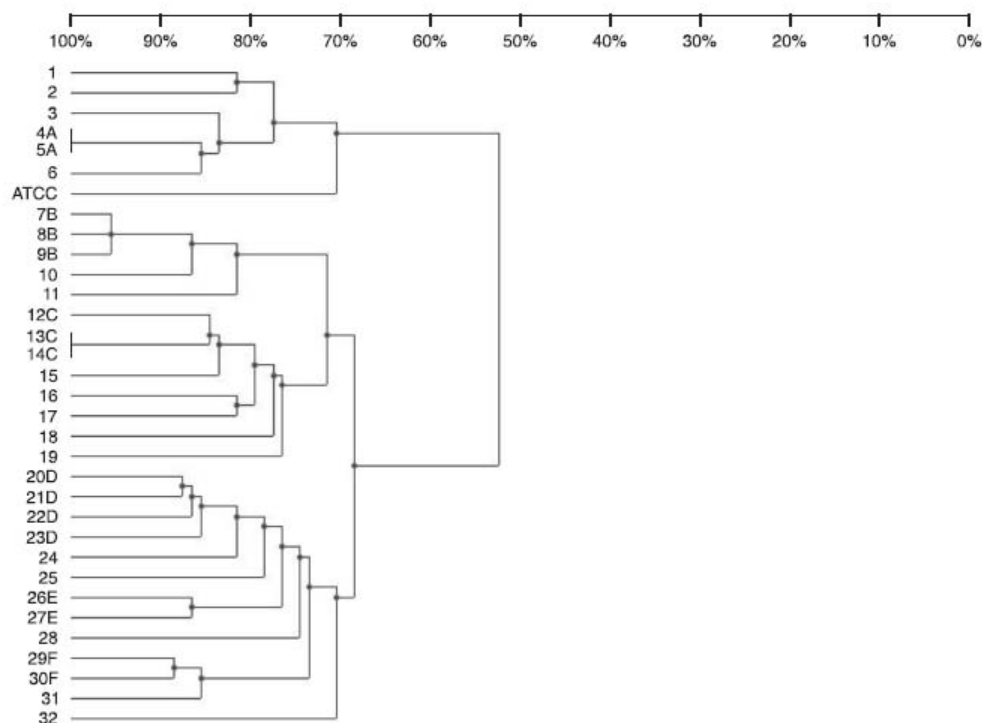


Figure 1. Dendrogram of pulsed-field gel electrophoresis profiles of 32 *Enterococcus faecalis* isolates (numbered isolates) and American type culture collection (ATCC) *E. faecalis* reference strain.

The ability of *Enterococcus* to survive in the environment facilitates the survival of multidrug-resistant strains, creating more opportunities for person-to-person transmission to occur. This attribute suggests that *Enterococcus* and its resistance to antimicrobial drugs could continue to pose a challenge for both clinicians and hospital epidemiologists. In addition, the concomitant isolation of enterococci and other microorganisms in blood cultures has been reported in 24-49% of cases (3,4,14,15). This can make therapeutic decisions even more difficult and potentially worsen prognosis. We observed a polymicrobial bacteremia prevalence of 48% with no significant difference between HLGR and non-HLGR isolates. However, the association of gentamicin-resistant strains and polymicrobial infections has not been conclusively established in the literature (13-15).

Patients with HLGR infections were significantly older than patients with non-HLGR infections. Previous studies, however, have not shown this difference comparing HLGR and non-HLGR *E. faecalis* infections (5,13,16). A low prevalence of HLGR, 4%, has been reported in a pediatric hospital (17). We speculate that the use of antimicrobials could be more judicious in pediatric patients, creating less selective pressure on drug-resistant bacteria. Additionally, the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program has identified age-associated differences in pathogen prevalence and antimicrobial susceptibility among organisms causing bloodstream infections in North American hospitals (18). This program found, for example, that bloodstream infections caused by VRE occurred more frequently in adults than pediatric patients. It is unclear why age-related differences in antimicrobial susceptibilities occur.

In our study, hematological malignancies were the only underlying disease or condition significantly associated with higher rates of bacteremias caused by HLGR. Other studies have shown association of HLGR infection with chronic renal failure (16). We hypothesize that our results may be related to the practice at our hospital of using antimicrobial prophylaxis with quinolones among hematological patients, which might contribute to the selection of resistant strains. Similarly, an association between HLGR and resistance to ciprofloxacin among *E. faecalis* isolates has been described in the UK and Ireland (19). The use of glycopeptides, quinolones, carbapenems, and cephalosporins has also been associated with the emergence of gentamicin resistance and selection of HLGR strains in the past (5,16). We found an association between HLGR and previous use of cephalosporin, quinolone, and carbapenem in the univariate analysis. This underscores the need for infection-control programs to promote judicious use of antimicrobials to decrease selective pressure on *E. faecalis*.

Our data showed that high-level resistance to both gentamicin and streptomycin was lower (22%) than other studies (41-82%) (5,14). Resistance to both of these aminoglycosides limits the treatment options in terms of combination therapy for severe enterococcal infections, such as endocarditis and meningitis. Of note, recommendations regarding the use of combination therapy for enterococcal bacteremia have not been delineated with certainty in the literature due to the absence of controlled trials to support it. However, infectious disease specialists recommend combination therapy for such infections, especially in critically ill patients (4).

The overall mortality among patients with enterococcal bacteremia was 46.2%, which is consistent with previous reports (30-68%) (3,4,15). Moreover, we found that mortality due to *E. faecalis* was similar regardless of the isolate's sensitivity to gentamicin, which is also consistent with the results of other studies (5,13,14). The high mortality rates observed in patients with enterococcal bacteremia may reflect the severity of underlying illnesses. Unfortunately, we were not able to determine the contribution of *E. faecalis* infection alone on mortality because patients commonly had other risk factors that could be associated with death, e.g., polymicrobial infection and advanced age.

Molecular typing of *Enterococcus* isolates showed high variability among isolates, even among HLGR isolates. This molecular diversity suggests that isolates were selected from endogenous intestinal flora, rather than a result of patient-to-patient transmission. Similar findings have been reported by others (11). Nonetheless, we found a few *E. faecalis* isolates with similar PFGE patterns, suggesting that patient-to-patient transmission might have also occurred at our hospital. The finding of HLGR and non-HLGR isolates with the same PFGE pattern can be explained by the fact that PFGE is based on chromosomal DNA; HLGR phenotype, on the other hand, is associated with plasmids, which can be transferred independently from chromosomal DNA.

Our study is subject to several limitations. First, due to its retrospective design, it was not possible to use a more accurate index of severity of illness, such as the acute physiology and chronic health disease classification system II (APACHE II), and control for it in our analysis. Second, only a few of the isolates were available for genotyping, which limited our ability to evaluate transmission patterns. Finally, we focused on cases occurring over a four-year period, which may not be enough time for changes in antibiotic susceptibility to occur.

This study is the first to highlight the clinical, epidemiological, and microbiological characteristics of *E. faecalis* bacteremia at a large tertiary teaching hospital in Brazil. In

addition, our results emphasize the need for strategies to improve infection-control practices, such as judicious use of antibiotics and monitoring of antibiotic resistance among hematologic patients. This could prevent further dissemina-

tion of HLGR, allow the monitoring of changes in enterococcal resistance patterns, and ultimately prevent the spread of VRE at our institution, which is currently limited to a few cases of colonization (20).

References

1. Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Thomsberry C, Sahn DF, Volturo GA. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3: 7.
2. Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1173-1176.
3. Malone DA, Wagner RA, Myers JP, Watanakunakorn C. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals. *Am J Med* 1986; 81: 601-606.
4. Maki DG, Agger WA. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management. *Medicine* 1988; 67: 248-269.
5. Noskin GA, Till M, Patterson BK, Clarke JT, Warren JR. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* bacteremia. *J Infect Dis* 1991; 164: 1212-1215.
6. Cereda R, Pignatari AC, Hashimoto A, Sader H. *In vitro* antimicrobial activity against enterococci isolated in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997; 1: 83-90.
7. Sader HS, Sampaio JL, Zoccoli C, Jones RN. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in three Brazilian medical centers. *Braz J Infect Dis* 1999; 3: 63-79.
8. Títze-de-Almeida R, Rollo FM, Nogueira CA, Rodrigues IP, Eudes FJ, Nascimento RS, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 197-205.
9. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16: 128-140.
10. 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.
11. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2059-2063.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.
13. Watanakunakorn C, Patel R. Comparison of patients with enterococcal bacteremia due to strains with and without high-level resistance to gentamicin. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 74-78.
14. Antalek MD, Mylotte JM, Lesse AJ, Sellick JA Jr. Clinical and molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* bacteremia, with special reference to strains with high-level resistance to gentamicin. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 103-109.
15. Gullberg RM, Homann SR, Phair JP. Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 74-85.
16. Caballero-Granado FJ, Cisneros JM, Luque R, Torres-Tortosa M, Gamboa F, Díez F, et al. Comparative study of bacteremias caused by *Enterococcus* spp. with and without high-level resistance to gentamicin. The Grupo Andaluz para el estudio de las Enfermedades Infecciosas. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 520-525.
17. Christie C, Hammond J, Reising S, Evans-Patterson J. Clinical and molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in a pediatric teaching hospital. *J Pediatr* 1994; 125: 392-399.
18. Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20: 412-418.
19. Woodford N, Reynolds R, Turton J, Scott F, Sinclair A, Williams A, et al. Two widely disseminated strains of *Enterococcus faecalis* highly resistant to gentamicin and ciprofloxacin from bacteraemias in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 711-714.
20. Tresoldi AT, Cardoso LG, Castilho GV, Dantas SR, von Nowakowski A, Pereira RM, et al. Low prevalence of vancomycin resistant enterococci colonization in intensive care patients in a Brazilian teaching hospital. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 239-241.

9- ANEXOS

ANEXO 1

Formulário utilizado para a revisão dos prontuários médicos dos pacientes com hemocultura positiva para *E. faecalis*

Nº: ____

Data da revisão: ____/____/____

Nome: _____

HC: _____ Idade: _____ (no momento da internação)

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: ☐M ☐F

Diagnóstico de internação: _____

Co-morbidades: 1) _____

2) _____

3) _____

Especialidade responsável: _____

DI: ____/____/____ Local de internação: _____

Hemoculturas positivas para *E. faecalis* e outros agentes

Referência	Data	Outro agente (S / N)	Segundo agente
1	____/____/____		
2	____/____/____		
3	____/____/____		
4	____/____/____		
5	____/____/____		

Antibiograma

Referência	Ampi	Cipro	HLGR	Peni	Estrepto	Vanco
1						
2						
3						
4						
5						

Culturas positivas para *E. faecalis* em outros sítios

Sítio	Data	Local	Antibiograma					
			Ampi	Cipro	HLGR	Peni	Estrepto	Vanco
1	___/___/___							
2	___/___/___							
3	___/___/___							
4	___/___/___							
5	___/___/___							

Sinais e sintomas clínicos

Valor máximo nas 48 horas que antecederam hemocultura positiva

Temperatura (___/___/___) : _____ °C Leucócitos: (___/___/___) : _____

Procedimentos utilizados antes do primeiro isolamento de enterococo em hemocultura

CVC ☐ Ventilação Mecânica ☐ SVD ☐

Cirurgia ☐ 1: _____ 2: _____

Drenos ☐ 1: _____ 2: _____

Antibiótico pré-hemocultura positiva ☐ sim ☐ não

quinolona ☐ ___ dias carbapenens ☐ ___ dias penicilinas ☐ ___ dias

cefalosporina ☐ ___ dias vancomicina ☐ ___ dias aminoglicosídeos ☐ ___ dias

metronidazol ☐ ___ dias

Sinais e sintomas nas 48 horas antes do óbito ou cura da infecção:

Maior temperatura: _____ Menor temperatura: _____ Leucócitos : _____

Maior FC: _____ Menor FR: _____

Maior P.A: _____ Menor P.A: _____

Vasopressores ☐ Internação em UTI / Reta: ☐

Cura da infecção: ☐ sim ☐ não Óbito por infecção: ☐ não ☐ sim

Data de alta: ___/___/___ Alta ☐ Óbito ☐

ANEXO 2

Protocolo de extração de DNA para *Enterococcus faecalis* técnica de “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) equipamento CHEF DR III System (Bio Rad)

Protocolo baseado em:

Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition site. J Clin Microbiol 1990, 28: 2059-63.

A. Extração do DNA

Dia 1

A partir de colônias de *Enterococcus faecalis* isoladas em Ágar Sangue com 24 a 48 h de crescimento, inocular aproximadamente 5–10 colônias em 20 mL de meio BHI (“Brain Heart Infusion”) a 37 °C so agitação (Shaker) por 24 horas.

Dia 2:

Transferir 1 ml de BHI para tubos “Ependorf” e centrifugar os tubos contendo as culturas a 12.000 rpm por 5 min a 20 °C.

Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 1 ml de solução salina 0,85% estéril (lavagem das células).

Centrifugar novamente a 12.000 rpm por 5 min a 20 °C. Descartar novamente o sobrenadante e ressuspender as células em 1 ml de salina 0,85%. Realizar o mesmo procedimento mais uma vez.

Ressuspender as células em 500 µl de Pet IV.

Preparo da solução Pet IV

100 ml 5 M NaCl

5 ml 1 M Tris pH 7,5

395 ml H₂O

Concentração final: 1M NaCl

0,01M Tris pH 7,5

Ressuspender a massa de células.

Adicionar 500 µl de agarose Low Melting a 2% em EC Buffer para cada amostra.

Preparo da solução EC Buffer	Concentração final
3 ml 1,0 M Tris pH 7,5	0,006 M
100 ml 5,0 M NaCl	0,1 M
100 m 0,5M EDTA	0,1 M
2,5 g Brij 58	0,5%
1,0 g Deoxicolato	0,2%
2,5 g Sarcosil	0,5%

Preparo da agarose – Low Melt agarose a 2%

1 g de Low Melt agarose para 50 mL de EC Buffer.

Dissolver a Low Melt agarose em EC Buffer utilizando banho-maria no forno de microondas.

Homogenizar com pipeta Pasteur e dispensar rapidamente a mistura de Low Melt com a suspensão de células nos moldes para PFGE, resfriar os blocos a 4 °C por 30 min (fazer 3 blocos por amostra).

Remover os blocos solidificados dos moldes e dispensá-los em “Wells” contendo 2 mL de de EC Buffer e 200 µl de lisozima (10 mg/ml).

Incubar por 24 horas a 37 °C.

Dia 3

Aspirar a solução de EC Buffer.

Lavar os blocos por 3 vezes com 3 ml de TE (Low-Molarity) por 30 min utilizando “Shaker” com baixa rotação.

TE (Low-Molarity)

Solução estoque	Concentração final
1m 0,5M EDTA pH 7,5	0,001M
5 ml 1,0M Tris pH 7,5	0,010M
494 ml H ₂ O	

Aspirar a solução Te (Low-Molarity) e cobrir os blocos com 2 ml de ESP.

ESP= EDTA (pH 9,3), sarcosyl 5%, proteinase K

Exemplo: Volume em mL

Amostra	(8 a 10)	(12)	(15)	(16 a 18)	(20 a 21)
0,625 EDTA	18	20	24	28	32
5% Sarcosil	4	5	6	7	8
20mg/mL Proteinase K	0,2	0,125	0,15	0,175	0,2

Incubar durante uma noite a 50 °C.

Dia 4:

Aspirar a solução de ESP.

Lavar os blocos com 3 mL de TE (Low-Mol) com intervalos de 30 min pelo menos por 3 vezes.

Estocar os blocos em 5 mL de TE (Low-Mol) a 4 °C.

B. Digestão do DNA por enzima de restrição – *SmaI*

Dia 1:

Cortar os blocos o suficiente para o manuseio.

Transferir os blocos para microplacas.

Lavar com 3 mL de solução “Dummy no Salt” à temperatura ambiente por 4 horas, sendo 4 lavagens de 1 hora.

Aspirar a solução.

Transferir os blocos para o tubo de “Eppendorf” ou microplaca e adicionar 300 µL de solução tampão R4 a cada frasco (deve ser preparado nesse momento):

30 µL de R4 x 9 amostras= 270 µL.

270 µL de H₂O Millipore estéril x 9 amostras= 2430 µL.

Manter essa solução por 30 min em geladeira a 4 °C.

Aspirar este tampão.

Adicionar a solução de digestão, sendo 200 µL de volume final para cada bloco (a ser preparado nesse momento):

4 µL de enzima Sma I x 9 amostras= 36 µL

20 µL de tampão R4 x 9 amostras= 180 µL

178 µL de H₂O Millipore estéril X 9 amostras= 1602 µL

Incubar à temperatura de 30 °C, por 6 a 24 h (de preferência em “Shaker”).

Dia 2:

Aspirar a solução.

Adicionar 1 mL de TE (Low Molarity)

Incubar à temperatura ambiente por 1 hora.

Preparar o gel de agarose ultrapuro, grau cromossômico, a 1% em TBE 0,5X.

Dissolver o gel em forno de microondas e dispensar o molde.

Preparo do Gel de 150 mL:

Para gel de 10 cepas= 150 mL.

TBE 0,5X = 15mL de TBE 5X:

135 mL de H₂O Millipore estéril.

1,5 g de agarose.

Após a solidificação, resfriar o gel a 4 °C por, no mínimo 30 min, antes de tirar o molde dos blocos.

Inserir os blocos nos sulcos do gel. Deixar 1 sulco para o marcador de peso molecular Lambda.

Selar os sulcos com agarose a 1% em TBE 0,5X.

Colocar o gel na cuba de eletroforese contendo 2,2 L de TBE 0,5X e deixar estabilizar a temperatura de corrida durante 30 min.

Preparo do tampão para eletroforese:

220 mL de TBE 5X

1980 mL de H₂O destilada

Condições de corrida

Volts por cm 6 V/cm

Temperatura 14 °C

Tempo inicial 5 s

Tempo final 35 s

Tempo de corrida 20 h

Ao final da corrida, corar o gel com brometo de etídio por 30 min.

Fotografar sob luz ultravioleta.

ANEXO 3

Outras co-morbidades presentes

Anóxia neonatal
Atresia de íleo
Atresia de jejuno
Cardiopatia congênita
Coarctação aórtica
Comunicação inter-atrial
Doença de Hirschsprung
Displasia neuronal
Gastroquise
Hipogamaglobulinemia
Microcefalia
Miopatia mitocondrial
Mitocondriopatia
Obstrução intestinal por brida
Onfalocele
Pré termo
Rins policísticos
Síndrome do intestino curto
Síndrome de Prune Belly
Síndrome do intestino grosso
Síndrome de Beckwith-Wiedemann

ANEXO 4

Estudos clínicos selecionados em ICS por *E. faecalis*

Características	Hycke et al., 1991	Noskin et al., 1991	Antalek et al., 1995	Saeedi et al., 2004
Número de pacientes incluídos	77	51	94	250
Período de estudo	1982–1987	1986–1990	1986–1999	1994–2001
Local do estudo	Universidade de Wiscosin, EUA*	VA** Lacksides Chicago, EUA	Buffalo VA New York, EUA	3 hospitais Ostergotland, Suécia
Desenho do estudo	Retrospectivo	Retrospectivo	Retrospectivo	Retrospectivo
Método Identificação Suscetibilidade	API 20S Microdiluição em caldo	API 20S Macrodiluição em caldo	Vitek GPI card Vitek GPS-TA	API Strep teste Método de referência sueco
Número de leitos	563	Não informado	550	694; 226; 406
Prevalência de HLGR (%)***	46,7%	63,0%	48,0%	14,0%

*Estados Unidos da América; **Veterans Affair; ***Alt

