

Análise da variabilidade genética de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina em um Hospital Terciário do Recife-PE

Autores:

Michelly Lopes da Silva

Bacharela em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife

Igor Vasconcelos Rocha

Doutor em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz-PE, Recife

Carlos Alberto das Neves de Andrade

Mestre em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz-PE, Recife

DOI: 10.58203/Licuri.22187

Como citar este capítulo:

SILVA, Michelly Lopes; ROCHA, Igor Vasconcelos; ANDRADE, Carlos Alberto das Neves. Análise da variabilidade genética de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina em um Hospital Terciário do Recife-PE. In: Jaily Kerller Batista (Org.).

Pesquisas e inovações em Ciências

Ambientais e Agrárias. Campina Grande: Licuri, 2024, p. 76-86.

ISBN: 978-65-85562-21-8

Resumo

Enterococcus faecium é uma bactéria Gram-positiva amplamente distribuída, frequentemente encontrada em infecções hospitalares. Devido à sua capacidade de adquirir e transmitir resistências através de elementos móveis, essas cepas podem se tornar multirresistentes, aumentando os riscos de complicações e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Este estudo teve como objetivo determinar a relação genética entre cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina, a partir de amostras clínicas de pacientes assistidos em hospital terciário do Recife, PE. As amostras foram coletadas por conveniência, de acordo com solicitação médica, e submetidas à identificação e testes de sensibilidade à vancomicina por microdiluição. O DNA genômico das cepas foi extraído e analisado por PCR utilizando oligonucleotídeos *vanA* e ERIC específicos, seguido de eletroforese em gel de agarose. A análise filogenética revelou a presença de nove clusters distintos, sendo o cluster A o mais prevalente (30,95%). Todas as cepas analisadas foram positivas para o gene *vanA* de resistência à vancomicina, além de apresentarem concentrações inibitórias mínimas (CIM) para vancomicina superiores a 256 µg/mL. Esses isolados foram predominantemente associados a pacientes idosos (>60 anos) (58,7%) e a sítios de colonização (90,7%). A diversidade genética encontrada sugere múltiplas origens de transmissão. A predominância em pacientes idosos e em sítios de colonização destaca a importância das ferramentas moleculares na epidemiologia, prevenção e rastreamento de surtos hospitalares.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Antibioticoterapia. Epidemiologia. Vigilância em Saúde.

INTRODUÇÃO

A disseminação clonal de isolados clínicos multirresistentes a antimicrobianos é associada a altas incidências de infecções pela mesma linhagem bacteriana, podendo resultar em surtos e epidemias, especialmente em ambientes hospitalares, onde estão frequentemente ligados a elevadas taxas de morbidade e mortalidade causadas pelas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (CATTOIR, 2022). As IRAS, definidas como infecções relacionadas ao cuidado do paciente, substituíram o conceito anterior de infecção hospitalar e são influenciadas por vários fatores, como idade, desnutrição, diabetes, tabagismo, tempo de internação, necessidade de procedimentos invasivos e uso excessivo de antibióticos, frequentemente resultando em infecções relevantes em diversos sítios clínicos, incluindo aqueles causados por isolados Gram-positivos multirresistentes aos antimicrobianos comuns (FIGUEIRA et al., 2022).

No Estado de Pernambuco, espécies como *Staphylococcus coagulase negativa* (CoNS), *Staphylococcus aureus*, *E. faecium* e *E. faecalis* são comumente associadas às IRAS, com as duas últimas sendo as principais responsáveis pelo desenvolvimento e propagação da resistência à vancomicina, um antimicrobiano frequentemente usado no tratamento de infecções invasivas (ANVISA, 2021; WILLEMS et al., 2011). A resistência à vancomicina é uma das maiores ameaças à saúde pública atualmente, aumentando o tempo de internação, os custos hospitalares e a mortalidade, e tem sido identificada em isolados de *Enterococcus* spp. desde 1988, sendo os principais mecanismos moleculares associados à sua resistência a disseminação dos genes *vanA* e *vanB* por meio de plasmídeos e *transposons* (LECLERCQ et al., 1988).

Após o primeiro caso identificado de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE) em 1986 na Europa, houve uma rápida disseminação do gênero nas Américas, especialmente envolvendo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Estima-se que 70% dos isolados de *E. faecium* atualmente sejam resistentes à vancomicina, o que está associado a uma alta taxa de mortalidade em pacientes com bacteremia provocada por VRE (ALMUZARA, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

A utilização crescente de métodos moleculares tem permitido o monitoramento da disseminação clonal de isolados clínicos multirresistentes, possibilitando a análise precoce de novos mecanismos de resistência antimicrobiana e o desenvolvimento de estratégias de contenção para prevenir surtos em larga escala (WILLEMS et al., 2005). Técnicas como o ERIC-PCR têm se destacado nesse contexto por sua capacidade de caracterizar a relação

genética entre espécies e cepas em poucas horas, oferecendo uma abordagem simples, resolutiva e econômica para discriminar diferentes tipos de cepas (BLANCO et al., 2018).

Essas técnicas moleculares têm um grande impacto clínico e epidemiológico, superando as limitações das técnicas tradicionais baseadas em características bioquímicas e sorológicas para a identificação de *Enterococcus* e outros microrganismos. Elas fornecem uma visão mais precisa e abrangente da resistência antimicrobiana, contribuindo para uma vigilância mais eficaz e intervenções preventivas mais direcionadas (AHAMDI; SIASI TORBATI; AMINI, 2023). Diante da crescente necessidade de estudos epidemiológicos para avaliar pacientes colonizados e surtos hospitalares, especialmente em hospitais de cuidados especializados, este estudo objetivou determinar a relação genética entre cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina, a partir de amostras clínicas de pacientes assistidos em hospital terciário do Recife.

METODOLOGIA

Isolados clínicos

Para a obtenção dos isolados bacterianos, um total de 46 cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina foi selecionado a partir de um banco de microrganismos armazenados por amostragem de conveniência no hospital de estudo, caracterizados entre setembro de 2021 e janeiro de 2023. A escolha dessas cepas foi realizada de forma criteriosa, considerando características como o fenótipo de resistência à vancomicina e a representatividade temporal e clínica dos casos.

A identificação das cepas bacterianas e a avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana foram inicialmente conduzidas no laboratório de Microbiologia Clínica do próprio local de estudo, sendo realizadas por meio de testes bioquímicos fenotípicos de rotina e utilizando a metodologia automatizada Vitek® 2 (bioMérieux). Os isolados foram então armazenados em meio LB (Luria-Bertani) suplementado com 15% de glicerol a uma temperatura de -20 °C. Os subcultivos seguintes foram realizados em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas para os procedimentos subsequentes deste estudo.

Perfil de resistência à vancomicina

O perfil de susceptibilidade à vancomicina foi avaliado utilizando a técnica de microdiluição em caldo, considerada padrão-ouro para esse tipo de análise, realizada de acordo com as recomendações do BrCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Para preparar o inóculo bacteriano, as colônias previamente cultivadas em placas de ágar Müeller-Hinton (Himedia) foram suspensas em 1 mL de Caldo Müeller-Hinton Cátion-ajustado (CA-MHB) estéril por meio da técnica de suspensão direta. A densidade óptica (OD) desta suspensão foi medida a 625nm utilizando espectrofotômetro, atingindo uma faixa de 0,08 a 0,13 UA (0,5 na escala de McFarland; concentração de $1-5 \times 10^8$ UFC/mL). Posteriormente, essa suspensão foi diluída em CA-MHB na proporção de 1:1000, em um volume suficiente para a inoculação dos poços da placa de microdiluição. Cada poço da placa foi então inoculado com 50 µL desta diluição final utilizando um pipetador automático multicanal, resultando em um volume final de 100 µL em cada poço, contendo a concentração desejada de cada antimicrobiano e uma densidade celular bacteriana aproximada de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL.

Como controle positivo de crescimento bacteriano, poços contendo CA-MHB livre de antimicrobiano foram inoculados com a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, enquanto como controle negativo de crescimento foram reservados poços contendo apenas CA-MHB, sem inoculação bacteriana. As placas de microdiluição foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18 horas, e após esse período, foram visualmente inspecionadas após a adição de resazurina para determinar a concentração inibitória mínima.

Extração de DNA genômico de *E. faecium*

Durante a etapa prévia ao experimento, foram inoculados 5 mL de meio de cultura contendo cada isolado a ser avaliado, sendo incubados a 37°C durante a noite. O processo de extração de DNA iniciou-se com a centrifugação do tubo Falcon a 3000 rpm por 10 minutos, seguida pelo descarte do sobrenadante. As células foram lavadas com 500 µL de tampão Tris-EDTA (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), transferindo o sedimento para um microtubo esterilizado. Após nova centrifugação a 6000 rpm/5 minutos e descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de tampão Tris-EDTA contendo 1% de Triton X-100, com a tampa dos tubos selada com Parafilm®. A lise celular foi realizada aquecendo os tubos em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Após esfriar à temperatura ambiente, a centrifugação a 13.000 rpm/3 minutos permitiu a coleta do sobrenadante,

transferido para outro microtubo esterilizado. Adicionalmente, 45 µL de NaCl 5M e 850 µL de álcool etílico absoluto foram adicionados (para obter álcool etílico 70%, foram utilizados 3 mL de água deionizada estéril e 7 mL de etanol absoluto), seguido por lenta inversão para homogeneização. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos e descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de álcool etílico 70% e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. O frasco foi invertido e deixado aberto à temperatura ambiente para evaporação natural do álcool. A suspensão do DNA foi realizada pela adição de 50 µL de tampão Tris-EDTA, evitando agitação brusca. O DNA foi quantificado através do equipamento *NanoDrop 2000C* e estocado a -20 °C, sendo posteriormente diluído para concentração de uso nas seguintes etapas.

Detecção de determinantes genéticos de resistência à vancomicina

A pesquisa dos principais determinantes genéticos de resistência foi conduzida através de reações de PCR individuais, cada uma com um volume final de 25 µL. Estas reações foram conduzidas utilizando as sequências iniciadoras dos genes *vanA-F* (5'-ATGAATAGAATAAAAAGTTGC-3') e *vanA-R* (5'-TCACCCCTTTAACGCTAATA-3'), a uma concentração de 10 mM cada, e *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), seguindo recomendações do fabricante. Os procedimentos foram realizados em um termociclador *GeneAmp 9700* (Applied Biosystems), começando com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação, compostos por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 60 segundos a 72°C. A extensão final ocorreu a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, a 120V por 45 minutos, e posteriormente foram visualizados sob luz UV em transiluminador.

ERIC-PCR e análise filogenética

A técnica de ERIC-PCR e análise filogenética foram utilizadas com o intuito de investigar a diversidade genética entre os isolados de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina. As amplificações do ERIC-PCR foram conduzidas utilizando as sequências iniciadoras de tipagem ERIC-F (5'-ATGAATAGAATAAAAAGTTGC-3') e *vanA-R* (5'-TCACCCCTTTAACGCTAATA-3'), a uma concentração de 10 mM cada, e *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), seguindo recomendações do fabricante.

O programa de ciclagem incluiu uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1,5% a 70V por 70 minutos em tampão TAE 1x.

A análise filogenética foi realizada com base no padrão de bandamento obtido, utilizando o software *Phylogenetic Inference Package*, PHYLIP-3.68. Um dendrograma foi gerado pelo método UPGMA (Método de Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética), considerando uma tolerância de 1% entre as distâncias detectadas. Os grupos geneticamente relacionados foram definidos por médias de dissimilaridade, seguindo o método interpretativo de Tenover (1995), no qual isolados com similaridade $\geq 80\%$ (dissimilaridade $\leq 20\%$) foram considerados geneticamente relacionados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características epidemiológicas da população estudada

A amostragem incluiu exames realizados ao longo de um período de dois anos, abrangendo amostras desde setembro de 2021 até janeiro de 2023. A confirmação das espécies de *E. faecium* foi realizada pelo serviço de origem das amostras, utilizando rotina clínica de automação Vitek®2 (bioMérieux), análises bioquímicas e antibiograma.

Dos 46 isolados analisados, 58,7% foram obtidos de pacientes idosos com mais de 60 anos e 27,9% das amostras foram provenientes de pacientes com idades entre 30 e 60 anos, enquanto 15,2% foram isoladas de pacientes com menos de 30 anos.

Dos isolados analisados, a maioria, totalizando 56,5%, foi proveniente da clínica médica, enquanto apenas 6,5% foram identificados em pacientes da UTI. Os 37% restantes estavam distribuídos em várias enfermarias do hospital, incluindo as unidades de Doenças Infecto-Parasitárias (DIP), Ortopedia, Vascular e Urologia, com distribuição de 4,3%, 6,5%, 21,7% e 4,3%, respectivamente.

A relação entre idade e infecção por VRE pode ser influenciada por diversos fatores, pacientes já debilitados por outras enfermidades, expostos a longos períodos de internação e a tratamentos prévios debilitantes, desta maneira a infecção hospitalar por VRE ocorre de maneira oportunista em pacientes idosos, que podem frequentemente estar

associados a outras infecções por bactérias multirresistentes (HEMAPANPAIROA, 2021; MAGIORAKOS, 2012).

Determinação do perfil de susceptibilidade à vancomicina

Todas as 46 amostras analisadas (representando 100% do conjunto) exibiram um perfil idêntico de resistência à vancomicina, caracterizado por concentrações inibitórias mínimas (CIMs) superiores a 256 µg/mL. Além disso, todas as amostras apresentaram genótipos positivos para o gene de resistência *vanA*.

Resultado semelhante ao encontrado na literatura, considerando que este gene é o principal mecanismo associado ao fenótipo de resistência à vancomicina no ambiente hospitalar (KANG et al., 2014). Nos isolados investigados, esse fenótipo demonstrou altos níveis de resistência à vancomicina, com concentrações inibitórias mínimas acima de 256 µg/mL, associado também a altos níveis de resistência à teicoplanina. Este cenário contribui cada vez mais para a utilização dos chamados antimicrobianos de reserva, antibióticos considerados como a última linha para o tratamento de infecções multirresistentes.

Análise filogenética entre os isolados de *E. faecium*

O resultado da análise por ERIC-PCR das 46 amostras está representado de forma gráfica na Figura 1. O dendrograma, construído pelo método UPGMA, agrupou os isolados com base na distância média entre os pares, variando de 0 (indicando células idênticas) a 40. O critério de interpretação de Tenover (1995) foi aplicado, considerando geneticamente relacionados àqueles isolados com um índice de dissimilaridade de até 20%. A tolerância utilizada na construção do dendrograma foi de 1%.

A análise da diversidade genética revelou padrões de bandejamento variando entre 100 pares de base (pb) e 2 quilobases (kb). Foram identificados oito clusters distintos, com o grupo A sendo o mais predominante, englobando 13 amostras (28,3%). Dentro deste grupo, observou-se a presença de seis clones com uma similaridade genética de 100% entre si, incluindo os isolados dos pacientes P38, P40, P42, P43, P36 e P37. O cluster F foi o segundo maior grupo identificado, contendo 10 clones (21,7%), sendo que os pacientes P17, P18 e P20 apresentaram uma similaridade genética de 100% entre si. Juntos, os clusters A e F agruparam metade dos isolados analisados. Os 23 isolados restantes foram

distribuídos entre os clusters menores: D (10,9%, n=05), G (8,7%, n=04), H e C, ambos com 6,5% dos isolados (n=03), e E e B, com 4,3% das amostras tipadas (n=02) cada. Quatro isolados (8,7%) não apresentaram qualidade de DNA suficiente para tipagem e foram classificados como não tipáveis (NT) (Figura 1).

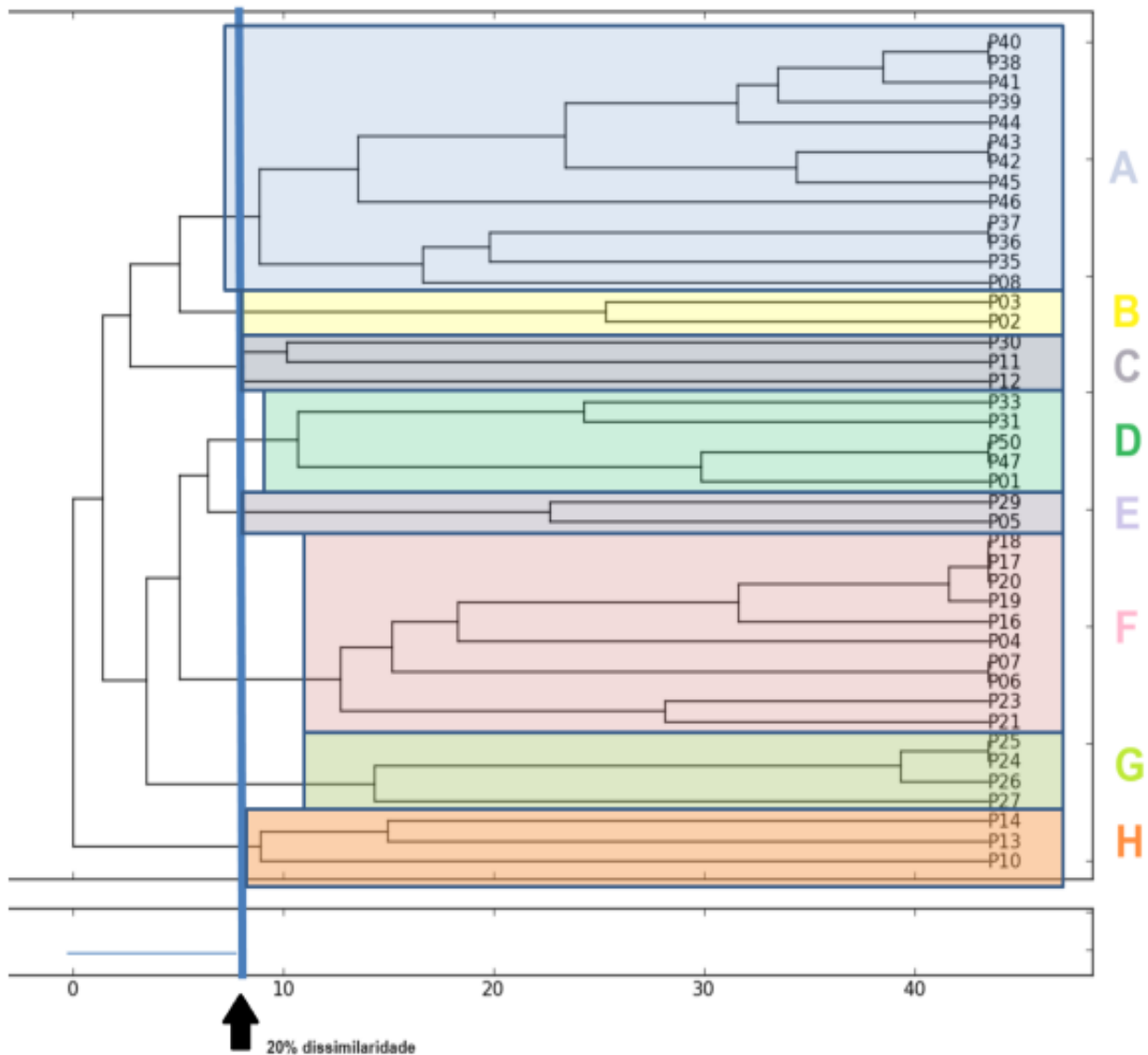


Figura 1: Dendrograma dos padrões de ERIC-PCR dos 46 isolados de *E. faecium*. Análise filogenética baseada em perfil gerado por ERIC-PCR em um padrão UPGMA, distinguidos por sua dissimilaridade. O eixo horizontal indica o percentual de dissimilaridade e o eixo vertical a similaridade genética entre os isolados avaliados. Cada uma das cores indica um grupo clonal (*cluster*).

A dispersão dos grupos clonais corrobora pesquisas que indicam que os surtos de *E. faecium* resistente à vancomicina (VREf) no Brasil são causados por cepas sem uma história

evolutiva comum. Isso contrasta com a predominância do complexo clonal CC17, observada na Europa e nos Estados Unidos, onde a maioria dos isolados em surtos hospitalares pertence a esse complexo (PALAZZO et al., 2011). A detecção precoce de pacientes colonizados ou infectados com VRE é crucial para prevenir a transmissão nosocomial dessas cepas, uma vez que a colonização por esses isolados precede o desenvolvimento de infecções (PALAZZO et al., 2011).

Em relação ao sítio de isolamento, todos os 13 isolados do cluster A foram provenientes de culturas de vigilância (sítio de colonização). Já no grupo F, dos 10 isolados agrupados, um foi identificado em uma urocultura enquanto os outros nove foram obtidos de culturas de vigilância. As demais amostras clínicas foram agrupadas em clusters distintos: uma urocultura (clusters B, C e H, cada um com um isolado), secreções (um isolado relacionado ao cluster D) e hemocultura (um isolado relacionado ao cluster H). Portanto, não houve predominância clonal em relação às amostras isoladas de sítios infecciosos.

Neste contexto, pacientes transferidos de outras unidades hospitalares, que frequentemente não dispõem de programas de monitoramento microbiológico adequados, enfrentam desafios significativos. Ao serem encaminhados para atendimento em hospitais terciários, esses pacientes podem potencialmente atuar como vetores de transmissão de clones bacterianos, aumentando o risco de exposição para outros indivíduos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo enfatizou a necessidade contínua de vigilância e controle de infecções em ambientes de cuidados de saúde, destacando a importância de medidas para limitar a disseminação intra-hospitalar de VRE. Além disso, a diversidade clonal observada sugere a possibilidade de transmissão intra-hospitalar dessas cepas.

Esses achados reforçam a importância da implementação de ferramentas moleculares no ambiente clínico, especialmente em hospitais que tratam pacientes de alta complexidade, como oncológicos e transplantados, para prevenir surtos hospitalares, controlar a colonização por bactérias multirresistentes e reduzir o surgimento de novos perfis de resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

AHAMDI, F.; SIASI TORBATI, E.; AMINI, K. A Comparative Study of ERIC-PCR and BOX-PCR Methods for Evaluation of Genomic Polymorphism among Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* Clinical Isolates. *mljgoums*, v. 17, n. 1, p. 13-19, 1 jan. 2023.

ALMUZARA, M. *Enterococcus* spp.: Resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 1 jan. 2013.

ANVISA, A. N. D. V. S. Relatório: Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana (RM) em serviços de saúde. Pernambuco, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-deinfeccao-e-resistencia-microbiana/copy_of_infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude. Acesso em: 08 fev. 2024.

BLANCO, A. E. et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates by chicken embryo lethality assay and ERIC-PCR. *Avian Pathology*, v. 47, n. 1, p. 23-32, 2 jan. 2018.

CATTOIR, V. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Current Opinion in Microbiology*, v. 65, p. 73-80, 1 fev. 2022.

FIGUEIRA, L. R. T. et al. Fatores que corroboram para a aquisição de infecção hospitalar: uma revisão de literatura. *Anais do II Congresso Nacional Multidisciplinar em Enfermagem On-line. Revista Multidisciplinar em Saúde*, 29 nov. 2021. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remis/article/view/2480>>. Acesso em: 7 fev. 2024.

HEMAPANPAIROA, J., et al. Does vancomycin resistance increase mortality? Clinical outcomes and predictive factors for mortality in patients with *Enterococcus faecium* infections. *Antibiotics*, v. 10, n. 2, 2021.

KANG, M. et al. Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu, China molecular characteristics of VRE in China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 33, n. 6, 2014.

LECLERCQ, R. et al. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. *New England Journal of Medicine*, v. 319, n. 3, 1988.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance Summary. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2015.

Disponível em: <<https://www.paho.org/en/file/54913/download?token=sBDXkDUk>>. Acesso em: 3 set. 2023.

PALAZZO, I. C. V. et al. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. *Journal of Hospital Infection*, v. 79, n. 1, 2011.

TENOVER, F. C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 9, 1995.