



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2018

**VERONIKA
LYKHOLAT**

**EPIDEMIOLOGIA DE ESTIRPES RESISTENTES
CAUSADORAS DE ITU**



**VERONIKA
LYKHOLAT**

**EPIDEMIOLOGIA DE ESTIRPES RESISTENTES
CAUSADORAS DE ITU**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Dr Elmano José da Cruz Ramalheira, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital do Baixo Vouga, EPE, co-orientação de Prof^a Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro, Aveiro, e co-orientação de Prof^a Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho a Meu Senhor e Salvador

“Deleita-te também no Senhor, e ele te concederá o que deseja o teu coração.
Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará.” (Salmos 37:4-5)
(de Almeida e Ferreira, 2008).

o júri

presidente

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira (co-orientador)

Prof.^a Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro

Doutora Inês Abrantes Cravo Roxo (arguente)

Bolseira de Investigação da Unidade de Sequênciação de Genomas CNC - Universidade de Coimbra

agradecimentos

Deixo o meu profundo agradecimento a todos que contribuíram para elaboração da minha tese:

Primeiro a Deus que abriu a porta, ofereceu esta oportunidade incrível e ainda deu forças e saúde para concluir o trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Elmano, agradeço pela confiança e paciência, muito obrigada.

À minha co-orientadora, Dr^a Sónia, pela orientação e sugestões importantes para meu trabalho.

À Dr^a Nadiya e Dr^a Catarina, que estiveram sempre ao meu lado, ajudando na adaptação e na recolha de dados no Serviço de Patologia Clínica, muito obrigada.

À minha família pelo apoio e inspiração.

palavras-chave

epidemiologia, infecções do trato urinário, resistência aos antibacterianos, XDR, MDR

resumo

As infecções do trato urinário (ITU) são processos inflamatórios de etiologia infecciosa localizados no sistema urinário. O exame bacteriológico de urina é um dos exames mais pedidos nos serviços hospitalares. O número de casos da resistência aos antibióticos tem aumentado continuamente durante as últimas décadas devido ao seu uso excessivo e a adaptação de bactérias na presença destes fármacos. A invasão do trato urinário por estas bactérias pode levar ao internamento prolongado, mau prognóstico ou septicémia. Portanto, o registo contínuo de novos casos de incidência de infecções causadas por estirpes multirresistentes e a avaliação de mecanismos de resistência ao antibacterianos têm elevada importância na prática clínica. O alvo deste estudo foi avaliar a prevalência de estirpes multirresistentes (MDR) em isolados de amostras de urina no Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV, Aveiro), no primeiro semestre de 2018. A identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) das estirpes isoladas da urina foram efetuados no sistema Vitek 2. Foram utilizados testes complementares para confirmar a presença de betalactamases de espectro alargado e confirmar a susceptibilidade à colistina. Durante o período que compreendeu este estudo foram isoladas 1289 estirpes, de EBU positivos tendo sido verificado que a maior percentagem de isolados provinha do serviço de Urgência. Registou-se uma maior prevalência de estirpes isoladas de amostras de urina no género feminino em comparação com o género masculino em todas as faixas etárias, sendo a percentagem mais elevada em pacientes >65 anos. Verificou-se que as estirpes isoladas mais prevalentes são bactérias Gram-negativas, tal como *E. coli* (53.9 %), *K. pneumoniae* (12.4 %), *P. mirabilis* (6.3 %), *P. aeruginosa* (5.3 %) e menos prevalentes são bactérias Gram-positivas, tal como *E. faecalis* (4.5%), *S. saprophyticus* (3.1 %), *S. aureus* (1.5 %), *E. faecium* (1.4 %) e fungos - *C. albicans* (2.1%). Da totalidade de isolados, 25.5 % (n=326) foram identificados como MDR sendo as espécies mais prevalentes *E. coli* (n=124), *K. pneumoniae* (n=97), *P. aeruginosa* (n=25), *E. faecium* (n=16), *S. aureus* (n=11). A maior taxa de multirresistência foi observada em estirpes de *A. baumannii* (100 %), *E. faecium* (88.9 %), *K. pneumoniae* (61.0 %), *S. aureus* (57.9 %), *P. aeruginosa* (36.8 %), *E. coli* (17.8 %), *P. mirabilis* (17.3 %). Foram ainda identificadas 11 estirpes XDR de *P. aeruginosa*. Observou-se o seguinte perfil da resistência aos antimicrobianos nas estirpes MDR: 89.0% foram resistentes à amoxicilina/clavulanato, 98.8 % à ampicilina, 78.6 % à ciprofloxacina, 66.6 % ao cotrimoxazol, 64.9 % à ceftazidima, 62.7 % à cefotaxima, 52.5 % à piperacilina/tazobactam, 51.4 % à cefepima, 51.0 % à gentamicina, 42.7 % à nitrofurantoína, 18.1 % à fosfomicina, 17.2 % à ampicacina, 11.4 % ao meropenem, 7.0 % ao ertapenem, 1.7 % à colistina. A maior prevalência de estirpes MDR nas faixas etárias avançadas pode estar relacionada: 1) com maior incidência de ITU nessa faixa etária; 2) com existência de outras comorbilidades frequentes nesta faixa etária; 3) internamentos prolongados e medicação intensiva nestes pacientes. Elevada resistência aos antibióticos nas estirpes MDR é preocupante. Tendo em conta a resistência aos antibacterianos detetada podemos concluir que a terapêutica empírica com maioria de beta-lactâmicos, exceto de carbapenemes, pode não ter efeito nas ITU causadas por estas estirpes. No entanto, a fosfomicina, nitrofurantoína, ampicacina podem ser utilizadas com maior segurança nestas infecções. O aparecimento de resistência aos antibacterianos de último recurso, tal como aos carbapenemes e à colistina pode levar a ausência das opções terapêuticas. Portanto, a terapia diferenciada baseada no TSA é a opção mais segura no tratamento das ITU. Como o perfil das resistências aos antibacterianos é específico para cada localidade geográfica, a monitorização epidemiológica contínua e a procura constante de soluções para diminuir os riscos associados às resistências bacterianas é de extrema importância na prática clínica das unidades de saúde locais e os seus dados são relevantes para elaboração ou atualização do tratamento empírico adequado.

keywords

surveillance, urinary tract infections, antibiotic resistance, XDR, MDR

abstract

Urinary tract infections (UTI) are inflammatory processes of infectious etiology located in the urinary system. However, the number of cases of antibiotic resistance has continuously increased over the last decades due to the adaptation of bacteria to growth in the presence of these drugs. Thus, the invasion of the urinary tract by these bacteria can lead to long hospitalization, bad prognosis and septicemia. Therefore, the continuous registration of new cases of incidence of infections caused by multidrug-resistant strains and the evaluation of anti-bacterial resistance mechanisms are highly important in clinical practice. The aim of this study was to evaluate the incidence of multidrug resistant bacteria in urine samples of patients attending in CHBV (Centro Hospitalar do Baixo Vouga) during first semester of 2018.

The strains identification and antibiotics susceptibility test (AST) were performed with Vitek 2 system. Confirmatory methods for extended spectrum beta lactamases production and colistin susceptibility were used.

A total of 1289 strains were isolated. It was verified that the highest percentage of isolates came from the emergency room. A higher prevalence of strains in females was registered when compared to males in all age groups, being the highest percentage in patients ≥ 65 years old. The major prevalence of Gram-negative bacteria such as *E. coli* (53.9 %), *K. pneumoniae* (12.4 %), *P. mirabilis* (6.3 %), *P. aeruginosa* (5.3 %) and a minor prevalence of Gram-positive bacteria, such as *E. faecalis* (4.5%), *S. saprophyticus* (3.1 %), *S. aureus* (1.5 %), *E. faecium* (1.4 %) and fungi - *C. albicans* (2.1%) were observed. From the total of isolated strains, 25.5 % (n=326) showed to be MDR, where the most prevalent species were: *E. coli* (n=124), *K. pneumoniae* (n=97), *P. aeruginosa* (n=25), *E. faecium* (n=16) and *S. aureus* (n=11). The highest rate of multidrug resistance was observed in strains of *A. baumannii* (100 %), *E. faecium* (88,89 %), *K. pneumoniae* (61,01 %), *S. aureus* (57,89 %), *P. aeruginosa* (36,76 %), *E. coli* (17,84 %) and *P. mirabilis* (17,28 %). Also, eleven strains of *P. aeruginosa* were identified as XDR. The following profile of antimicrobial resistance in MDR strains was observed: 89.0% were resistant to amoxicillin/clavulanate, 98.8 % to ampicillin, 78.6 % to ciprofloxacin, 66.6 % to cotrimoxazole, 64.9 % to ceftazidime, 62.7 % to cefotaxime, 52.5 % to piperacillin/tazobactam, 51,4 % to cefepime, 51.0 % to gentamicin, 42.7% to nitrofurantoin, 18.1 % to fosfomycin, 17.2% to amikacin, 11.4 % to meropenem, 7.0 % to ertapenem, 1.7 % to colistin.

The higher prevalence of MDR strains in the advanced age ranges may be related: 1) with higher incidence of UTI in this age group; 2) with the existence of other frequent comorbidity in this age group; 3) prolonged hospitalizations and intensive medication in these patients. Considering the resistance to antibiotics detected we can conclude that empirical therapy with a majority of beta-lactams, except for carbapenems, may have no effect on UTI caused by these strains. However, fosfomycin, nitrofurantoin, amikacin can be used more safely in these infections. The emergence of resistance to antibacterials of last resort, such as to carbapenems and colistin may lead to the absence of therapeutic options. Therefore, differentiated therapy based on the TSA is a safer option in the treatment of UTI. As the profile of antibacterial resistance is specific to each geographical location, continuous epidemiological monitoring and constant demand for solutions to reduce the risks associated with bacterial resistance is of utmost importance in clinical practice of local health units. Hence, epidemiological data are relevant for the elaboration or updating of the appropriate empirical treatment..

Índice.

LISTA DE PUBLICAÇÕES	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Infecções do trato urinário.....	7
2. Virulência bacteriana	8
3. Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	8
4. Fármacos utilizados no tratamento de ITU.....	10
4.1. Sulfonamidas e Trimetoprim.....	10
4.2. Fosfomicina.....	11
4.3. Nitrofurantoína.....	11
4.4. Beta-lactâmicos	12
4.5. Fluoroquinolonas	14
4.6. Glicopeptídeos	15
4.7. Aminoglicosídeos.....	16
4.8. Colistina	17
4.9. Tigeciclina.....	17
5. Escolha de antibióticos para tratamento de ITU.....	18
5.1. Tratamento empírico de ITU em Portugal.....	19
6. Microrganismos causadores de ITU	20
6.1. Causadores de ITU da família <i>Enterobacteriaceae</i>	20
6.1.1. <i>Escherichia coli</i>	20
6.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
6.1.3. <i>Proteus spp.</i>	22
6.2. Outras bactérias Gram-negativas causadoras de ITU.....	22
6.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
6.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
6.3. ITU causadas por bactérias Gram-positivas.....	23
6.3.1. <i>Staphylococcus spp.</i>	23
6.3.2. <i>Enterococcus spp.</i>	24
6.4. Fungos.....	25
7. Prevenção e controlo de resistência aos antibióticos	25
II. OBJETIVOS.....	27
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
1. Local e período da colheita de amostras	33
2. Colheita e registo das amostras.....	33
3. Avaliação de parâmetros bioquímicos da urina e o exame citológico	33
4. Coloração de Gram	34
5. Identificação e TSA das estripes causadoras de ITU.....	34
6. Deteção de ESBL pelo Vitek 2	34
7. Métodos da confirmação da presença de resistência a ANB	34
7.1. Confirmação da presença de carbapenemases.....	34
7.2. Teste de susceptibilidade à colistina	35

7.3.	Confirmação da presença de ESBL.....	35
7.4.	Confirmação da presença de PBP2a.....	35
8.	Base de dados.....	35
9.	Tratamento estatístico de dados	36
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
1.	Caracterização geral da população	39
1.1.	Estratificação de estirpes isoladas por faixas etárias e género.....	39
1.2.	Estratificação de isolados por serviços e géneros.....	40
1.3.	Espécies isoladas	41
1.4.	Estratificação de estirpes isoladas por tipo de amostra	45
1.5.	Estratificação de isolados mais prevalentes de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> pelos serviços hospitalares e género.....	48
2.	Caracterização geral de estirpes MDR isoladas	48
2.1.	Estratificação de estirpes MDR pelas várias faixas etárias	50
2.2.	Estratificação de estirpes MDR por tipo de amostra	51
3.	Caracterização de estirpes MDR de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	53
3.1	Estirpes MDR de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	53
3.2	Estratificação de estirpes MDR de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> pelas várias faixas etárias	54
3.3	Estratificação de estirpes MDR <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> pelos vários serviços hospitalares em ambos os géneros	55
4.	Outros isolados MDR recolhidos de amostras de urina	56
4.1.	<i>Proteus mirabilis</i>	56
4.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
4.3.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	58
4.4.	<i>Staphylococcus spp.</i>	59
4.5.	<i>Enterococcus spp.</i>	59
4.6.	<i>Candida spp.</i>	60
5.	Perfil da resistência aos antibióticos nos isolados MDR	61
5.1	Resistência às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos	62
5.2	Resistência aos beta-lactâmicos.	62
5.3	Resistência combinada	64
6.	Prevenção e controlo de RA em Portugal	65
	CONCLUSÃO.....	68
	REFERENCIAS	69
	ANEXOS	78
	Anexo I. <i>Surveillance of multidrug resistant bacteria causing UTI (abstract)</i>	79
	Anexo II. Tratamento recomendado em ITU seguido de NP n° 015/2011.....	81
	Anexo III. Perfil da resistência em isolados Gram-negativos causadores de UTU	82
	Anexo IV. Perfil da resistência em isolados Gram-positivos causadores de UTU.....	83
	Anexo V. Valores de RA nos isolados invasivos em Portugal disponibilizados por <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i> para 2013 e 2016 (ECDC, 2017).....	84

Lista de publicações

Esta dissertação inclui os resultados de seguinte publicação:

V. Lykholat, E. Ramalheira, S. Ferreira. Surveillance of Multidrug Resistant Bacteria Causing Urinary Tract Infection ICIDH 2019: 21st International Conference on Infectious Diseases and Health, Sydney, Australia, January 30-31, 2019.

(Anexo I)

Lista de abreviaturas

Amox/Clav – amoxicilina associada ao ácido clavulânico

ANB – agentes antimicrobianos

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

CHBV – Centro Hospitalar do Baixo Vouga

CLED - *cystine lactose eletrolyte deficient*

CPE – carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

EBU – exame bacteriológica de urina

ECDC - *European Centre for Disease Prevention e Control*

ESBL – extended-spectrum beta lactamases

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Fa – frequência absoluta

Fr – frequência relativa

ITU - infeções do trato urinário

UTI - urinary tract infections

IACS – infeções associadas aos cuidados de saúde

KPC- *Klebsiella. pneumoniae* carbapenemase

LPC - lipopolissacarídeos

MDR - multidrug resistant

MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

NP – norma portuguesa

PDR - pandrug resistant

Pip/Taz -piperacilina associada ao tazobactam

PPCIRA - Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos

RA - resistência aos antibióticos

THG – transferência horizontal de genes

TU - trato urinário

UCI - unidade de cuidados intensivos

VRE - vancomycin resistant *Enterococcus*

VRSA – vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*

WHO - World Health Organization

XDR - extendent drug resistant

Lista de figuras

Figura 1. Semelhanças na conformação da penicilina (a) e os dois resíduos de D-Ala terminais da cadeia peptídica (b)	13
Figura 2. Inativação da transpeptidase por penicilina (a) e a formação da ligação cross-linking entre cadeias peptídicas do peptidoglicano (b).....	13
Figura 3. Ciprofloxacina	14
Figura 4. Colónias de <i>E. coli</i> no meio CLED (a) e no agar MacConkey (b)	21
Figura 5. Colónias de <i>K. Pneumoneae</i> no meio CLED (a) e agar MacConkey (b).....	21
Figura 6. Distribuição de estirpes isoladas por faixas etárias e género.....	39
Figura 7. Distribuição de estirpes isoladas entre os serviços hospitalares em ambos os géneros.....	41
Figura 8. Espécies recolhidas de amostras de urina mais prevalentes	42
Figura 9. Distribuição de isolados mais prevalentes nos géneros feminino e masculino.....	43
Figura 10. Número de isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> nos vários serviços hospitalares nos ambos os géneros: F – género feminino; M – género masculino.....	48
Figura 11. Número de estirpes MDR isoladas nos serviços de urgência e internamento.....	50
Figura 12. Frequência relativa de isolados MDR nas várias faixas etárias (a) e número absoluto de isolados MDR nas várias faixas etárias nos ambos os géneros (b)..	51
Figura 13. Número de estirpes MDR isoladas dos vários tipos de amostras.....	52
Figura 14. Número de estirpes MDR isoladas dos vários tipos de amostras nas várias faixas etárias.....	53
Figura 15. Frequência relativa de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> nos todos isolados de urina nos vários serviços hospitalares em ambos géneros: F – género feminino; M – género masculino.....	55
Figura 16. Colónias de <i>Acinetobacter baumannii</i> no meio CLED (a) e agar MacConkey (b) isoladas das amostras de urina	58
Figura 17. Perfil da resistência aos antibacterianos nos isolados MDR e nos isolados não MDR.....	61

Lista de tabelas

Tabela 1. Percentagens das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas	41
Tabela 2. Distribuição de isolados mais prevalentes nos vários tipos de amostras.....	46
Tabela 3. Estirpes multirresistentes isolados das amostras de urina.....	49
Tabela 4. Distribuição de estirpes multirresistentes isoladas pelas faixas etárias	49
Tabela 5- Perfil da resistência nos isolados MDR das crianças até dois anos	51
Tabela 6. Frequencia relativa de estirpes MDR em amostras recolhidas por vários métodos.....	52
Tabela 7. Distribuição de estirpes MDR de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> entre géneros..	53
Tabela 8. Distribuição de isolados multirresistentes de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> nas várias faixas etárias.....	54
Tabela 9. Perfil da resistência aos antibacterianos nos isolados de <i>P. mirabilis</i>	56
Tabela 10. Perfil da resistência aos antibacterianos nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> ...	57

I. Introdução

Introdução

Uma das infecções mais comumente adquirida na comunidade e em meio hospitalar é a infecção do trato urinário (ITU) (Tandogdu & Wagenlehner, 2016). As ITU são processos inflamatórios de etiologia infecciosa que ocorrem no sistema urinário ou numa parte do sistema urinário (rins, uréteres, bexiga) e que se caracterizam pela presença de bactérias e sintomas da infecção bacteriana (Norma PT, 2011). Contudo, algumas bactérias podem invadir o trato urinário inferior sem provocar a doença tratando-se neste caso da bacteriúria assintomática (Bailey & Scott, 2014). Estima-se que 50 % das mulheres tenham pelo menos uma ITU durante a vida, o que leva a despesas na ordem de bilhões de euros (Griebing, 2005). ITU adquiridas nos hospitais são um grande problema e constituem uma elevada parte das infecções nosocomiais as quais frequentemente causadas por estirpes multirresistentes (Burke et al., 1996; WHO, 2002; Kamat et al., 2009). A incidência de ITUs depende da eficiência das defesas do hospedeiro e da virulência das bactérias. Assim, o sistema imunitário comprometido ou a existência de várias comorbidades levam a uma maior suscetibilidade às ITU e a um pior prognóstico (Foxman, 2014). Por outro lado, os fatores de virulência bacteriana que permitem a invasão, a aderência eficaz aos tecidos mucosos ou a presença de genes associados a resistência aos antimicrobianos aumentam a probabilidade e a gravidade da infecção ou diminuem as opções terapêuticas, respetivamente (Mobley et al., 2009; Terlizzi et al., 2017). Por exemplo, somente as estirpes de *E. coli* com proteínas específicas aderentes podem invadir o epitélio urinário (Canas-Ferreira et al., 2000).

São relatados frequentemente casos de ITU provocadas por estirpes resistentes à medicação, de difícil tratamento, que podem levar à bacteriémia ou a doenças do trato urinário superior (Kamat et al., 2009; Jean et al., 2016; Miotla et al., 2017). Para tratamento de infecções causadas por bactérias são utilizados antibióticos, ou seja, medicamentos cujo princípio ativo é um composto químico, natural, semi-sintético ou sintético que destrói ou impede o crescimento e a multiplicação dos microrganismos (Patrick, 2005). Antibióticos (ANB) que inibem o crescimento e multiplicação de bactérias são bacteriostáticos, os que levam à lise da célula bacteriana são bactericidas. Dependendo da sua ação antibacteriana distinguem-se os ANB que afetam a síntese de parede celular, a síntese de proteínas, a síntese de metabólitos importantes para o crescimento bacteriano, inibem a transcrição e a replicação de DNA ou atuam sobre membranas. Quando uma bactéria se adapta ao crescimento na presença de um ANB

desenvolvendo vários mecanismos de resistência, a ação antibacteriana destes fármacos fica comprometida. Portanto, se a infecção é causada por uma estirpe resistente e se for aplicado um tratamento empírico inapropriado, a doença pode: ter mau prognóstico, levar a bacteriemia e ao prolongamento do tempo da hospitalização (de Kraker et al., 2011; Lee et al., 2011). Cerca de metade dos estudos avaliados por Naylor et al., 2018 associam o aumento significativo da mortalidade com resistência aos antibióticos (RA). O conceito de resistência não é novo e surgiu logo no início da introdução dos antibióticos na prática clínica, no entanto, a prevalência de doenças causadas por estirpes resistentes aumentou para níveis preocupantes nas últimas décadas (Hoban et al., 2012; ECDC, 2017). O *European Centre for Disease Prevention e Control* (ECDC) divulga os dados sobre o crescimento da resistência combinada aos múltiplos ANB na União Europeia nos últimos anos (ECDC, 2017) e o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) disponibiliza os seguintes dados no seu site oficial – as bactérias resistentes aos ANB causam 2 milhões de doenças e 23 mil mortes por ano nos Estados Unidos da América. Estima-se que as bactérias resistentes matem 700 mil humanos por ano e esse valor pode aumentar até 10 milhões em 2050 se nada for feito (O’Neill, 2014). Atualmente já não existem antibióticos de reserva eficazes e as doenças provocadas por estirpes com resistência combinada às várias classes de ANB, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.* e MRSA têm poucas opções para o tratamento. A descoberta do gene *mcr-1*, em 2015, que confere a resistência à colistina mediada por plasmídeos, e a detecção deste gene em bactérias, em 30 países, em 2017, pode significar que num futuro próximo, este antibiótico de último recurso pode tornar-se ineficaz (Caniaux et al., 2016; ECDC, 2017). Atualmente, surgiu a necessidade da introdução de novos termos para descrição de estirpes multirresistentes. Assim, um grupo de peritos definiu critérios da inclusão de bactérias multirresistentes nos seguintes grupos propostos: MDR – *multidrug resistant* (resistentes pelo menos um ANB de três classes distintas), XDR – *extended drug resistant*, (resistentes a todas as classes de ANBs exceto uma ou duas), PDR – *pandrug resistant* (resistentes a todas as possíveis opções de tratamento) (Magiorakos et al., 2011). Para definir brevemente as estirpes resistentes de alta importância foi introduzido um outro acrónimo - ESKAPE constituído pelas iniciais dos microrganismos seguintes: *Enterococcus* resistente à vancomicina, *S. aureus* resistente à meticilina, *Klebsiella* produtora de ESBL, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* resistentes ao imipeneme, *Enterobacter* resistente às cefalosporinas de terceira geração e *Clostridium difficile* que foi recentemente integrado neste grupo (Paiva et al., 2014). Estas estirpes estão

associadas frequentemente às infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) ou doenças nosocomiais provocadas por estirpes multirresistentes provenientes do meio hospitalar (Weiner et al., 2016). As IACS podem ser associadas à estadia em instalações hospitalares, e surgir após intervenções associadas aos cuidados de saúde ou após internamento. Estima-se que 12 a 24% destas doenças são ITU com valores de resistência a todos antibióticos acima de 20% (Tandogdu & Wagenlehner, 2016). Das 12 estirpes resistentes aos antibióticos incluídos na lista de patógenos da prioridade global (*global priority pathogens list*, global PPL) definidas em 2017 pela WHO como estirpes de prioridade crítica, alta e média para desenvolvimento de novos medicamentos, as estirpes causadores da ITU estão incluídas nas categorias da prioridade crítica (*Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenemes, *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemes e cefalosporinas de 3ª geração) e prioridade alta (*Enterococcus faecium*, resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina, vancomicina e com resistência intermédia à vancomicina, *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas de 3ª geração e fluoroquinolonas) (WHO, 2017).

O aumento contínuo da RA deve-se ao abuso na utilização destes fármacos no sector de saúde que levou à seleção de estirpes resistentes. Segundo os dados do INFARMED o uso de ANBs na comunidade, em Portugal, está acima da média europeia diminuindo ligeiramente nos últimos anos devido ao aumento no controlo da sua prescrição (Paiva et al., 2014). Outro factor que contribui para o aumento da resistência é o facto de por vezes os mesmos ANB serem utilizados na produção animal da mesma forma que nos humanos (Vincent & Viola, 2006; Liu et al., 2016). Por outro lado, o desenvolvimento de novos antibióticos é muito dispendioso e pouco rentável em comparação com os fármacos para doenças crónicas e degenerativas. Os gigantes farmacêuticos estão pouco interessados em fazer os investimentos no desenvolvimento de fármacos antibacterianos, um processo que se pode prolongar até 10 anos, enquanto que as resistências surgem em pouco tempo (O'Neill, 2015). Tudo isto levou a uma diminuição drástica na produção de novos ANBs nas últimas décadas (Spellberg et al., 2008; Ventola, 2015). A disseminação de RA não está só restrita ao meio hospitalar, as estirpes resistentes podem ser adquiridas na comunidade, sendo a monitorização epidemiológica contínua e a procura constante de soluções para diminuir os riscos associados à resistência bacteriana de extrema importância na prática clínica atual.

O diagnóstico microbiológico é uma primeira etapa na investigação epidemiológica das doenças infecciosas, pois a qualquer investigação epidemiológica precede a

identificação do agente etiológico ou causador da infeção (Bailey & Scott, 2014). Em geral, a epidemiologia tem como alvo o estudo da prevalência e incidência das doenças específicas e procura definir os riscos associados ao aparecimento da doença de modo a introduzir as medidas preventivas e os cuidados específicos essencialmente nos grupos de maior risco (Canas-Ferreira et al., 2010). Assim, a epidemiologia das doenças infecciosas tem como alvo a identificação da fonte da infeção, a investigação do modo de transmissão da doença, bem como a determinação de fatores de risco que podem agravar a doença e levar ao mau prognóstico (Bailey & Scott, 2014). Os estudos epidemiológicos observacionais podem ser retrospectivos e prospetivos e basear-se numa análise de grande quantidade de amostras populacionais provenientes dos exames clínicos com acesso ao histórico de modo a identificar a exposição aos fatores do risco prováveis ou para a comparação da eficácia de várias opções de tratamento aplicadas (Cornaglia et al., 2012). Assim, a vigilância epidemiológica de RA pode ter como alvo a avaliação da incidência de infeções causadas por estirpes RA (Cornaglia et al., 2004) e tem interesse em analisar a frequência das infeções documentadas causadas por bactérias resistentes, a prevalência das estirpes resistentes entre as espécies envolvidas na infeção, o número de eventos na população exposta. Nesses estudos ainda é necessária a estratificação de dados referente ao tipo da infeção, o serviço, tempo da hospitalização, idade, género, histórico, existência comorbilidades ou outros parâmetros. A elevada prevalência de ITU e o aumento contínuo de RA fazem com que as avaliações contínuas de padrões da suscetibilidade aos ANBs dos patógenos causadores de ITU tenham uma elevada importância na prática clínica (Stefaniuk et al., 2016). Assim, os estudos contínuos da prevalência de ITU permitiram a identificação de vários grupos da população com maior probabilidade de incidência dessas doenças (Foxman, 2014). Nesses grupos de risco incluem-se as grávidas, idosos (Miotla et al., 2017), indivíduos com doenças crónicas, internados nas unidades de cuidados intensivos (UCI) ou algaliados. (Stark et al., 1984; Maki et al., 2001; Nicolle et al., 2014). O controlo epidemiológico contínuo é importante para monitorização do estado atual da incidência de ITU causadas por estirpes resistentes e pode servir de base à deliberação posterior do tratamento empírico adequado à situação real.

Assim, neste trabalho pretende-se avaliar a prevalência de estirpes multirresistentes isoladas de amostras de urina no Serviço da Patologia Clínica, de 1 de janeiro a 30 de junho de 2018, das amostras de urina dos utentes do Centro Hospitalar do Baixo Vouga

(CHBV), e avaliar a sua prevalência referente ao gênero e à faixa etária nos vários serviços hospitalares.

1. Infecções do trato urinário

Baseado na estrutura do trato urinário as ITU são classificadas em doenças do trato urinário inferior e trato urinário superior (Bailey & Scott, 2014). As ITU inferiores estão instaladas na bexiga e uretra, e caracterizam-se pela disúria, polaquiúria, hematúria, turbidez e odor forte na urina, dor na região suprapúbica (Foxman 2014). Já as ITU superiores afetam os ureteres e tecido renal envolvendo os sintomas seguintes: febre, calafrios, dor lombar, vômito e náuseas. As ITU podem ser complicadas quando são associadas às alterações estruturais ou funcionais do trato urinário ou às doenças crônicas, tal como diabetes (Silva, 2008; Bailey & Scott, 2014). A maioria das infecções nas mulheres não são complicadas enquanto nos homens ITU quase sempre são graves. Normalmente as cistites são infecções não complicadas, sendo as doenças mais graves as pielonefrites, as bacterémias/urosépsis e doenças provocadas por estirpes resistentes e de difícil erradicação (Bailey & Scott, 2014). Por outro lado, ITU podem ser agudas ou crônicas, de origem comunitária ou hospitalar (Silva, 2008). As infecções recorrentes, em alguns indivíduos, são associadas às mesmas estirpes que formam biofilmes, os quais se tornam uma fonte de infecções repetitivas (Maki et al., 2001). As bactérias que causam as ITU podem ter origem hematogénica, linfática ou invadir o trato urinário por via ascendente (Bailey & Scott, 2014). Normalmente a doença é ascendente e os microrganismos provenientes da zona perianal podem contaminar a zona periuretral e invadir primeiro o trato urinário inferior, depois o superior e nos casos mais graves podem levar à sépsis. Estima-se que 25% das sépsis têm como origem uma ITU (Bailey & Scott, 2014). A ocorrência de ITU nosocomiais está associada às estadias prolongadas, à instrumentação e terapia antibacteriana intensiva (Kamat et al., 2009; Burke et al., 1996; WHO, 2002). Por exemplo, a algaliação aumenta três vezes o risco de incidência de ITU que podem ou não apresentar a resistência ao tratamento com antibióticos. O risco da infecção aumenta proporcionalmente ao tempo de algaliação, pois a incidência de infecções aumenta 5%, por dia da algaliação (Stark et al., 1984; Maki et al., 2001; Nicolle, 2014). Assim, nos pacientes cateterizados, as bactérias podem ser introduzidas logo durante a colocação de catéter ou posteriormente devido a formação dos biofilmes ascendentes por

forças capilares no exterior do tubo (acesso extralumenal) ou refluxo do saco colector no interior deste (acesso intralumenal) (Maki et al., 2001).

2. Virulência bacteriana

Existem milhares espécies de bactérias, mas somente algumas estirpes patogénicas (virulentas) podem causar doenças (Bailey & Scott, 2014). De facto, estamos rodeados por bactérias que nos contaminam continuamente, mas são eliminadas eficazmente pelo nosso sistema imunitário. Muitas delas não conseguem passar as barreiras exteriores ou não encontram as condições ótimas para seu crescimento no nosso organismo. Para conseguir invadir o nosso organismo as bactérias necessitam um sistema de adesão eficaz e mecanismos da defesa contra o sistema imunitário (Mittal et al., 2009; Mobley et al., 2009; Terlizzi et al., 2017). Nalguns casos as bactérias comensais tornam-se os patógenos-oportunistas e podem provocar doenças nos indivíduos imunodeprimidos devido às doenças crónicas, às obstruções no trato urinário, tratamentos prolongados, má nutrição, idade avançada (Tseng et al., 2002; Marschall et al., 2012) ou passar barreiras exteriores devido a instrumentação e procedimentos invasivos.

As doenças mais graves são provocadas por microrganismos que produzem toxinas que podem danificar os tecidos, alterar o metabolismo, levar à necrose ou provocar resposta inflamatória (Mobley et al., 2009; Canas-Ferreira et al., 2010; Terlizzi et al., 2017). As toxinas podem ser específicas (pertencem só uma estirpe) ou inespecíficas, tal como lipopolissacarídeos (LPS) da membrana exterior das bactérias Gram-negativas que é uma endotoxina libertada após a morte das bactérias e é um antigénio que provoca uma resposta inflamatória considerável (Canas-Ferreira et al., 2010).

3. Mecanismos de resistência aos antibióticos

Um dos mecanismos mais importantes da resistência aos antimicrobianos é a produção de enzimas que catalisam as reacções de modificação estrutural de fármacos, o que torna os inativos. Por exemplo, betalactamases, AAC(6'), *FosA* são representantes dessas enzimas e podem hidrolisar, acetilar, fosforilar os ANB (Patrick., 2005). Desde os anos 80, os microrganismos produtores de betalactamases de espectro alargado (ESBL, *extended spectrum beta-lactamases*) são considerados um problema a nível global. Embora já tenham sido detetados nos vários géneros das bactérias Gram-negativas são mais prevalentes nas espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* (Kumar & Varela., 2013). Existem

vários tipos de betalactamases: AmpC cefalosporinases, ESBL – de tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA (oxacilinas que não podem ser inibidas por clavulanato e tazobactam) e carbapenemases (Spadafino et al., 2014; Mairi et al., 2017). Uma base de dados recente, que é atualizada semanalmente, registou 2666 tipos de betalactamases até ao fim de abril de 2017 (Naas et al., 2017).

A modificação do alvo do antibiótico pode torná-lo ineficaz. São exemplos a produção de PBP2a (*penicillin binding protein 2A*), que são as transpeptidases modificadas que têm pouca afinidade para beta-lactâmicos, ou a modificação de ribossomas de modo que estes perdem a afinidade para os ANB que inibem a síntese proteica (Ballhausen et al., 2014; Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). Algumas bactérias podem hiperproduzir o alvo ou desenvolver vias metabólicas alternativas de modo que a eficácia do ANB fica comprometida (Patrick, 2005; Sivertsen et al., 2016).

A entrada de antibióticos depende da permeabilidade de células bacterianas aos fármacos. As bactérias Gram-negativas possuem porinas na membrana exterior através das quais muitos ANB hidrofílicos entram no espaço periplásmico (Delcour, 2008). A entrada de ANB lipofílicos depende da composição lipídica de lipopolissacarídeos da membrana exterior das bactérias Gram-negativas. Algumas bactérias possuem poucas porinas e são intrinsecamente impermeáveis a ANB, outras devido a pressão seletiva perdem as porinas e tornam-se resistentes (Patrick, 2005; Fernández & Hancock, 2012).

Contudo, mesmo que o ANB tenha conseguido passar todas as barreiras membranares pode não conseguir atingir a concentração letal no interior da célula bacteriana devido a expulsão por bombas de efluxo. De acordo com a sequência de aminoácidos as bombas de efluxo são diferenciadas em 5 famílias: ABC (*ATB-Binding Cassete*), MFS (*Major facilitator superfamily*), MATE (*Multidrug and Toxic Compounds Extrusion*), RND (*Resistance-Nodulation-Division*) e SMR (*Small Multidrug Resistance*) (Poole, 2004; Kumar & Varela, 2013). As bombas de efluxo de família MFS prevalecem nas bactérias Gram-positivas enquanto RND e MATE nas bactérias Gram-negativas.

Outro mecanismo de resistência a ANB é a formação de biofilmes (Hoiby et al., 2010; Gonçalves et al., 2017). Quando as bactérias produzem matriz extracelular esta protege-as contra perigos ambientais e defesas do hospedeiro. Assim, as células na superfície podem ser afetadas, mas no interior do biofilme permanecem intactas constituindo um foco de inóculo permanente e podendo provocar as infeções recorrentes.

Muitas bactérias possuem resistências intrínsecas aos ANB codificadas nos cromossomas que passam de geração em geração (Magiorakos et al., 2011; EUCAST,

2016). Por exemplo, algumas bactérias são resistentes às cefalosporinas devido a produção de AmpC cromossômicas que podem ser induzidas sob a pressão por beta-lactâmicos ou inibidores de betalactamases (Peleg et al., 2008). Um dos problemas é a possibilidade de transferência horizontal de genes (THG) entre estirpes ambientais com resistência intrínseca e estirpes patogênicas parentes que leva à transmissão e disseminação de genes de resistência alojados nos elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposões, sequências da inserção, ilhas da patogenicidade ou integrões (Ochman et al., 2000). Essa resistência é adquirida e não é habitual para o tipo selvagem da bactéria podendo ser transferida por mecanismos de conjugação, transformação e transdução ou surgir devido às mutações genéticas (Patrick, 2005; Canas-Ferreira, 2010). A pressão seletiva e a capacidade de sobreviver na presença de ANBs podem levar ao aparecimento de novas estirpes resistentes, multirresistentes, com resistência alargada e pan-resistentes (Magiorakos et al., 2011).

4. Fármacos utilizados no tratamento de ITU.

Para tratamento de ITU são utilizados vários antibióticos de modo a erradicar o agente infeccioso do trato urinário. Dependendo da sua estrutura molecular diferenciam várias classes de ANB: beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, glicopeptídeos, tetraciclina, polimixinas e outros. (Patrick, 2005, Canas-Ferreira et al., 2010). Muitos ANB apresentam um largo espectro de ação contra vários tipos de bactérias patogênicas, outros têm afinidade para bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. No entanto, devido a farmacodinâmica e farmacocinética específica de cada ANB, a eficácia variável sobre bactérias específicas é definida pelos fármacos de primeira, segunda linha, etc. para cada doença (Katzung & Trevor, 2017). Assim, a seguir apresenta-se a descrição de fármacos utilizados no tratamento de ITU.

4.1. Sulfonamidas e Trimetoprim

Um dos fármacos mais utilizados nos anos 70 para tratamento de ITU foi o cotrimoxazol (combinação de sulfametoxazol e trimetoprim). Este fármaco exerce a atividade bacteriostática inibindo a via metabólica da síntese de tetra-idrofolato necessário para síntese de bases pirimidínicas e DNA. A sulfonamida mimetiza o ácido para-aminobenzóico (PABA) um substrato natural da diidropteroato sintetase e compete com ele no local da ligação (Patrick, 2005; Katzung BG & Trevor AJ. 2017). Como a

ligação é reversível, alguns microrganismos adaptam-se ao efeito sulfonamida através do aumento da síntese de PABA resistindo assim a ação deste fármaco. Trimetoprim inibe a diidrofolato redutase, ou seja, um outro passo na biossíntese de folatos. Embora esta enzima exista nos humanos, as diferenças na estrutura são muito significativas, de modo que o trimetoprim inibe 100 000 vezes mais a enzima bacteriana do que a enzima humana. Portanto, o cotrimoxazol inibe dois passos da síntese de folatos simultaneamente exercendo um bloqueio sequencial e permite diminuir a dose de sulfonamida e trimetoprim e, conseqüentemente, diminuir os efeitos secundários. O mecanismo da resistência ao cotrimoxazol são mutações nos genes que codificam as enzimas diidropteroato sintetase e diidrofolato redutase que levam a menor afinidade para sulfonamida e trimetoprim, respectivamente. Assim, a resistência mediada por integrões residentes nos plasmídeos ou cromossoma de *Enterobacteriaceae* levou a ampla distribuição de genes *sul1*, *sul2*, *sul3* e vários genes *dfr* que codificam as enzimas diidropteroato sintetase e diidrofolato redutase que conferem a resistência a sulfonamida e trimetoprim, respectivamente (Frank et al., 2007; Skold et al., 2001).

4.2. Fosfomicina

Fosfomicina trometamol é uma droga da primeira linha no tratamento das infecções do trato urinário não complicadas de baixa toxicidade e bem tolerável (Schito, 2003; Keating, 2013) Devido ao aumento de RA hoje é reintroduzido na prática clínica para o tratamento de infecções causadas por bactérias MDR (Tulara, 2018). Possui um largo espectro de ação bactericida com um mecanismo de ação único efetivo contra vários uropatógenos - *E. coli* incluindo produtores de ESBL, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *Pseudomonas spp.*, MRSA (Patwardhan & Singh, 2017; Tulara, 2018). Uma única dose tem efeito de 3-7 dias do tratamento com fluoroquinolonas, cotrimoxazol, furantoina nas cistites não complicadas ou cefuroxima e amoxicilina associado ao ácido clavulânico nas mulheres grávidas (Keating, 2013). Estudos recentes mostram a eficiência deste fármaco no tratamento de ITU por ESBL produtoras comparável com os carbapenemos e a colistina (Veve et al., 2016; Tulara, 2018).

4.3. Nitrofurantoína

Nitrofurantoína, tal como a fosfomicina, é uma droga da primeira linha no tratamento das infecções do trato urinário não complicadas (Gupta et al., 2011), mas não deve ser utilizada nas grávidas, (categoria B) uma vez que pode causar uma anemia hemolítica no feto ou possíveis efeitos teratogênicos (Crider et al., 2009), e em ITU causadas por *Pseudomonas spp.* e *Proteus spp.* (Katzung & Trevor, 2017). Pode ser utilizada nas

infecções causadas por estirpes produtoras de ESBL, mas parece ter efeito menos acentuado em *K. pneumoniae* em comparação com *E. coli* (93,7% para 57,7%, respetivamente) (Tulara, 2018). O seu efeito bactericida deve-se a sua redução em metabolitos tóxicos que reagem inespecificamente com proteínas ribossomais afetando a síntese de proteínas, RNA, DNA etc. (Katzung & Trevor, 2017). A nitrofurantoína é um medicamento de administração oral que atinge pouca concentração nos tecidos e plasma devido à excreção muito rápida através da urina por filtração glomerular e a secreção tubular. Assim, não pode ser utilizado no tratamento de ITU superiores e prostatites (Gupta et al., 2011; Katzung & Trevor, 2017). Por outro lado, nos doentes com insuficiência renal pode atingir níveis tóxicos sistémicos e nenhum efeito na ITU (Katzung & Trevor, 2017).

4.4. Beta-lactâmicos

Os antibióticos beta-lactâmicos foram os antibióticos mais prescritos em todo o mundo, durante bastante tempo, devido ao largo espectro de ação e poucos efeitos secundários em comparação com outras classes de ANB. Em Portugal, continuam a ser um medicamento de primeira escolha no tratamento de ITU (NP n° 015/2011). Estes ANB incluem as sub-classes de antibióticos que possuem um anel beta-lactâmico na sua estrutura, o qual é ligado ao anel de tiazolidina nas penicilinas e anel de diidrotiazina nas cefalosporinas (Patrick, 2005). Os carbapenemos possuem um átomo de carbono em vez de enxofre e uma ligação dupla no anel pirrólico. O anel beta-lactâmico funciona como centro ativo e, ao ligar às transpeptidases microbianas, os beta-lactâmicos impedem a formação de ligações *cross-linking* entre as cadeias polipeptídicas pré-formadas do peptidoglicano. A transpeptidase reconhece dois resíduos de D-Ala terminais e cliva a ligação entre eles formando a ligação éster entre uma deles e a sua serina (Patrick, 2005). Quando a glicina (Gly) ligada outra cadeia peptídica se aproxima do local ativo da enzima (resíduo da lisina) forma-se a ligação peptídica entre resíduo D-Ala e Gly terminal da pentaglicina, libertando-se a enzima para a próxima ação. Assim, duas cadeias peptídicas estabelecem uma ligação *cross-linking* entre a D-Ala de uma cadeia e a L-Lis de outra cadeia por pontes da pentaglicina. Pensa-se que a penicilina mimetiza duas D-Ala (Figura 1) e a transpeptidase cliva o anel beta-lactâmico ficando este permanentemente ligado ao local ativo desta (Figura 2). A inativação da transpeptidase compromete a última etapa da síntese da parede celular bacteriana o que leva à lise e à morte da bactéria. Como as células humanas não possuem o peptidoglicano, nem D-Ala, os antibióticos beta-lactâmicos não as afetam. Assim, os antibióticos beta-lactâmicos são a primeira escolha

para o tratamento de várias infecções, incluindo ITU, com exceção de casos de hipersensibilidade a estes antibióticos (Bader et al., 2016). Os primeiros antibióticos beta-lactâmicos possuem melhor afinidade para com as bactérias Gram-positivas do que para com as bactérias Gram-negativas. De fato, nas bactérias Gram-negativas a passagem de

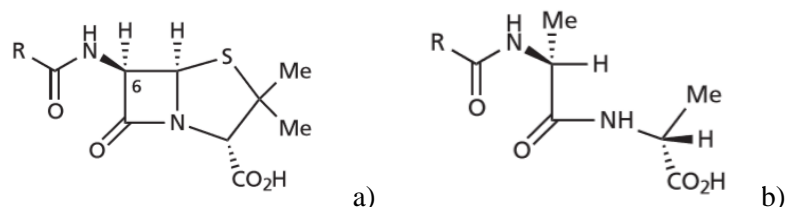


Figura 1. Semelhanças na conformação da penicilina (a) e os dois resíduos de D-Ala terminais da cadeia peptídica (b) (Adaptado de Patrick, 2005)

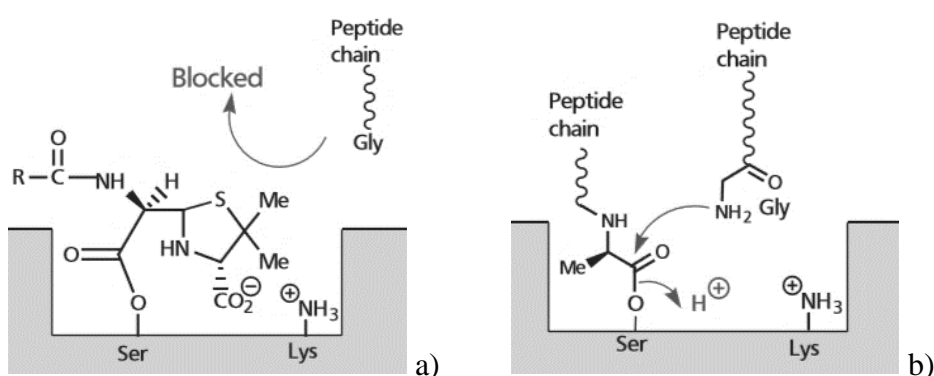


Figura 2. Inativação da transpeptidase (polígono cinzento) por penicilina (a) e a formação da ligação cross-linking entre cadeias peptídicas do peptidoglicano (b) (Adaptado de Patrick, 2005)

antibióticos depende da afinidade para as porinas da membrana exterior que têm um papel crucial no controlo da quantidade do fármaco que passa para o espaço periplásmico (Canas-Ferreira et al., 2010). Em regra, as moléculas grandes hidrofóbicas e com a carga negativa não podem passar através das porinas enquanto que as pequenas hidrofílicas que existem em forma zwitterion podem (Patrick, 2005). Assim, se houver uma alteração nas porinas que impeça o *uptake* de antibiótico, a concentração no espaço periplásmico pode ser insuficiente para inibir a síntese da parede celular. Como a resistência a penicilina, devido a produção das penicilinas e betalactamases, surgiu pouco tempo após a sua descoberta, foi sintetizada a meticilina que contém um escudo estérico lateral que impede a ligação de betalactamases, mas não interfere na ligação à transpeptidase (Patrick, 2005). Posteriormente foram sintetizados muitos outros derivados da penicilina e análogos de beta-lactâmicos, nomeadamente, as aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina), cefalosporinas de várias gerações, cefamicinas e carbapenemos que têm largo espectro de ação devido da presença de vários substituintes que aumentam a afinidade para as porinas das bactérias Gram-

negativas. Os monobactames (aztreonam) só contêm um anel e não exercem efeito nas bactérias Gram-positivas e anaeróbios, mas podem ser administrados nas infeções causadas por bactérias Gram-negativas nos indivíduos alérgicos às penicilinas e às cefalosporinas. No entanto, devido a habilidade incrível de adaptação, as bactérias continuaram a adquirir resistência através da produção de várias outras betalactamases (penicilinases, betalactamases de espectro alargado (ESBL), carbapenemases que inativam os antibióticos ao hidrolisar o anel beta-lactâmico (Bush & Jacoby, 2010; Naas et al., 2017). Para inibir estas enzimas os antibióticos beta-lactâmicos são frequentemente combinados com os inibidores de betalactamases, tal como ácido clavulânico, tazobactam, avibactam que, ao ligarem-se às betalactamases, bloqueam-nas e os beta-lactâmicos conseguem desempenhar a sua função bactericida. No entanto, algumas bactérias expostas aos inibidores de betalactamases aumentam a produção de betalactamases, tal como as AmpC cromossómicas, o que leva à resistência a estas combinações de fármacos.

Por vezes, durante o exame bacteriológico de urina são isoladas estirpes bacterianas que possuem a resistência a todos antibióticos beta-lactâmicos incluindo os carbapenemos (Mairi et al., 2017; Falagas et al., 2014). Existem dois tipos de resistência aos carbapenemos com genótipos, perfis de sensibilidade aos antibióticos e transmissão diferentes. Algumas bactérias podem produzir beta-lactamases (AmpC ou ESBL), possuir mutações, que alteram a expressão das porinas, o que confere a resistência às cefalosporinas, e ainda impermeabilidade que confere resistência aos carbapenemos. Outras bactérias produzem enzimas - carbapenemases que hidrolisam os carbapenemos. A principal carbapenemase de importância clínica em Portugal é serina-carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* (KPC). Os outros exemplos são Nova Deli metalo-betalactamase (NDM), primeiramente isolada na Índia, Verona *integron-encoded* metalo-betalactamase (VIM), oxacilinase de tipo 48 (Oxa-48), imipenemase metalo-beta-lactamase (IMP).

4.5. Fluoroquinolonas

Fluoroquinolonas são fármacos da segunda linha no tratamento das infeções do trato urinário não complicadas e são particularmente úteis devido à sua acumulação na urina, excreção através do trato urinário e alta eficácia contra enterobactérias, as principais causadoras de ITU (Bader et al., 2016). A sua ação antibacteriana deve-se a inibição da síntese de DNA bacteriana através da interação com as polimerases bacterianas. O primeiro representante, o ácido nalidíxico, foi sintetizado em 1962 (Patrick, 2005). A introdução de átomo de flúor, na posição 6, levou ao aumento da atividade e *uptake*

celular e deu a origem à enoxacina, uma fluoroquinolona de largo espectro de ação antimicrobiana. O substituinte básico na posição 7 melhorou ainda mais as suas propriedades farmacocinéticas devido a habilidade da formação de zwitterion com o grupo carboxílico. A introdução de outros substituintes, nomeadamente de um grupo de ciclopropila na posição 1 e do átomo de azoto na posição 8 deu a origem à ciprofloxacina e levou ao aumento da atividade de espectro largo e da atividade contra *S. aureus*, respetivamente (Figura 3). A ciprofloxacina, ainda, tem melhor atividade antipseudomonas em comparação com outras fluoroquinolonas provavelmente por produção de ROS (Jensen et al., 2014) durante sua ação, no entanto nas doses subletais esses mesmos ROS podem levar a mutações e à resistência ao este fármaco (Jorgensen et al., 2013). No entanto, o surgimento rápido da R às fluoroquinolonas de segunda geração

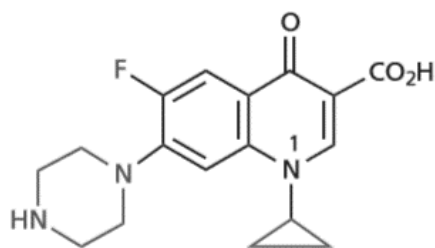


Figura 3. Ciprofloxacina (Adaptado de Patrick, 2005)

(por exemplo, *S. aureus*) e pouca atividade contra as bactérias anaeróbicas levou a procura de novos compostos ativos e foram sintetizadas as fluoroquinolonas da terceira e quarta geração, tal como a levofloxacina, moxifloxacina e besifloxacina. A resistência às fluoroquinolonas deve-se às mutações nos genes que codificam subunidade de DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e subunidade IV de DNA topoisomerase (*parC*) que leve a modificação do alvo dos antibióticos, às alterações nas porinas membranares e *up*-regulação de bombas de efluxo, tal como de tipo *QepA* e *OqxAB* que têm afinidade por quinolonas hidrofílicas (Redgrave et al., 2014). Outro tipo de resistência, mediada por plasmídeos foi recentemente descoberto, nomeadamente a produção de proteínas protetoras de DNA topoisomerasas, de enzima AAC(6')-Ib-cr que catalisa a acetilação de fluoroquinolonas e outras codificadas em *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* genes que protegem DNA girase e topoisomerase IV das quinolonas (Park et al., 2012; Redgrave et al., 2014; Rezazadeh et al., 2016). Estudos mostram que a resistência às quinolonas desenvolve-se sob a exposição as doses subletais de antibiótico (Hughes & Andersson, 2012; Jorgensen et al., 2013).

4.6. Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos, por exemplo vancomicina A, que foi introduzida em 1965 para o tratamento de infeções causadas por *S. aureus* resistente à penicilina e descontinuada depois da descoberta da meticilina, não consegue passar a membrana lipopolissacarídica das bactérias Gram-negativas, devido ao seu tamanho. Assim, esta molécula é

preferencialmente utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, nomeadamente MRSA e *Enterococcus* spp. (Walsh, 1999). Tal como os antibióticos beta-lactâmicos, a vancomicina interfere na síntese de parede de peptidoglicano ao ligar as cadeias pentapeptídicas através das ligações de hidrogénio e formando uma espécie de escudo sobre estas (Patrick, 2006). A seguir ocorre a formação de dímeros de vancomicina, também através de ligações de hidrogénio. Deste modo, a transglicosidase e a transpeptidase não têm acesso para catalisar transpeptidação e a transglicosidação entre NAM e NAG (ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina). Os genes *vanA* e *vanB*, responsáveis pela resistência à vancomicina, codificam a substituição de D-Ala terminal por D-Lac nas cadeias peptídicas preformadas de modo que a ligação entre vancomicina e a cadeia peptídica carece de uma ligação de hidrogénio, o que é suficiente para o antibiótico se tornar ineficaz. Recentemente, descobriu-se que alguns destes genes podem ser silenciados e apenas são expressos depois da exposição à vancomicina (Sivertsen et al., 2016). O aparecimento de estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) levou à redução drástica das opções para o tratamento das infecções respetivas ou tornou-o impossível.

4.7. Aminoglicosídeos

Quando as bactérias causadoras de ITU exibem a resistência aos beta-lactâmicos os aminoglicosídeos podem ser utilizados como alternativa, especialmente nas infecções complicadas de trato urinário superior (NP nº 015/2011). Os aminoglicosídeos são excretados via renal atingindo altas concentrações na urina. A dose deve ser bem controlada devido aos possíveis efeitos nefrotóxicos e ototóxicos (Katzung & Trevor, 2017). A amicacina é ativa contra bactérias Gram-negativas aeróbias incluindo produtoras de ESBL, *P. aeruginosa* MDR, *Acinetobacter* spp. e enterobactérias resistentes aos carbapenemos (CRE, *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*), enquanto que o uso de tobramicina e gentamicina não é aconselhável no tratamento de ITU devido à resistência frequente (Bader et al., 2016). Os aminoglicosídeos ao ligarem-se à subunidade 30S do ribossoma impedem a translocação desta ao longo de mRNA o que leva à paragem da síntese proteica (Patrick, 2006). As proteínas curtas não acabadas ao incorporarem-se na membrana alteram a sua permeabilidade, o que facilita a passagem de aminoglicosídeos. Os aminoglicosídeos são antibióticos com efeito bactericida, cujas moléculas são carregadas positivamente o que favorece a absorção na membrana exterior de bactérias Gram-negativas (Patrick, 2006). A interação iónica com vários grupos com

carga negativa leva à dissipação de íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} destruindo as pontes entre os polissacarídeos e formando os poros através dos quais os antibióticos passam. A sua passagem através da membrana interior é energia-dependente por isso os aminoglicosídeos não podem ser administrados em combinação com antibióticos bacteriostáticos, mas atuam bem em sinergia com antibióticos que agem sobre a parede celular. Resistência aos aminoglicosídeos deve-se à modificação (metilação) do 16S RNA o que impossibilita a ligação de aminoglicosídeos à subunidade pequena do RNA ribossomal (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). Outras enzimas podem inativar os próprios aminoglicosídeos por acetilação (AACs, N-acetiltransferases), adenilação (ANTs, O-nucleotidiltransferases) ou fosforilação (APHs, O-fosfotransferases).

4.8. Colistina

A polimixina E (colistina) foi um medicamento largamente utilizado após a sua descoberta, no entanto, a sua utilização foi restrita ao uso tópico devido aos efeitos secundários nefro- e neuro-tóxicos. A colistina atua como os detergentes catiónicos através da ligação seletiva e a destruição das membranas das bactérias Gram-negativas (Katzung & Trevor, 2017). Atualmente, é utilizada em casos em que outros antibióticos menos tóxicos não são eficazes. Assim, é utilizada no tratamento de ITU provocadas por estirpes multirresistentes XDR de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter*. Durante muito tempo pensou-se que a colistina seria um antibiótico seguro do ponto de vista de resistência, uma vez que os genes que lhes conferem resistência se situam no cromossoma, e deste modo não são facilmente transmissíveis. No entanto, recentemente foi descoberta a resistência à colistina mediada por plasmídeos em estirpes isoladas de humanos e animais, ou seja, a resistência com alta probabilidade para THG que pode levar a panresistência (Liu et al., 2016).

4.9. Tigeciclina

A tigeciclina pertence a uma nova classe de antibióticos, as glicilciclinas. Foi descoberta nos anos 90 (Sum et al., 1994) e aprovada pelo FDA para uso terapêutico em 2005. Tem maior afinidade para a ligação à subunidade 70S de ribossoma bacteriano em comparação com a tetraciclina, mas não é afetada por mecanismos de resistência à tetraciclina (bombas de efluxo ou proteínas protetoras de ribossoma) (Bauer et al., 2004). Este antibiótico é útil no tratamento de infeções causadas por microrganismos multirresistentes, tal como MRSA, VRE, MDR *Acinetobacter spp.* e *Enterobacteriaceae* produtoras ESBL, KPC, metalo-beta-actamases (Sader et al., 2014). Não é muito recomendada para tratamento de ITU devido a excreção limitada através da urina (Bader

et al., 2016) e desenvolvimento rápido de resistência (Chiu et al., 2017; Du et al., 2018). No entanto, quando existem poucas alternativas para o tratamento de ITU causadas por estirpes produtoras de carbapenemases pode ser utilizada, em concentrações altas, em associação com outras classes de antibióticos (Falagas et al., 2014).

5. Escolha de antibióticos para tratamento de ITU.

Estudos epidemiológicos mostram que em 80% dos casos de ITU não complicadas registados nos EUA são prescritos antibióticos (Kobayashi et al., 2016). Cada país deve ser utilizar esquemas próprios para o tratamento de infeções baseados nos estudos epidemiológicos locais dos diferentes países. Portanto, o tratamento empírico deve ter como base a situação atual da resistência aos antibióticos no país em questão, devido à variação de padrões de suscetibilidade aos antibióticos com a área geográfica específica (Baile t al., 2006). A definição da terapêutica empírica entra em linha de conta com a epidemiologia das estirpes mais comuns causadoras de ITU e com os padrões de resistência de determinado local (Cornaglia et al., 2004; Bader et al., 2016). O conhecimento da estirpe em causa permite considerar a presença de resistência intrínseca a vários antibióticos evitando o seu uso errado. Por outro lado, os resultados de TSA permitem detetar a presença da resistência aos antibióticos adquirida e utilizar antibióticos alternativos.

Os antibióticos de primeira linha no tratamento empírico clássico de ITU agudas não complicadas, nas mulheres não grávidas, são a nitrofurantoína ou fosfomicina (Bader et al., 2016). A segunda linha de opções inclui fluoroquinolonas e beta-lactâmicos com os inibidores de betalactamases. Considerando a produção de betalactamases AmpC e a resistência aos beta-lactâmicos as opções disponíveis para o tratamento de ITU são restritas às opções seguintes: nitrofurantoína, fosfomicina, fluoroquinolonas, cefepimas, piperacilina/tazobactam e carbapenemos (Bader et al., 2016). Se a estirpe causadora de ITU produz ESBL poderão estar disponíveis as opções seguintes: nitrofurantoína, fosfomicina, fluoroquinolonas, cefoxitina, piperacilina/tazobactam, carbapenemos, ceftazidima/avibactam, ceftolozam/tazobactam e aminoglicosídeos. Por outro lado, devido a possibilidade da combinação de vários tipos de ESBL e aquisição de outros tipos de resistência (AmpC plasmídicas ou mutações em OMP) recomenda-se o uso de carbapenemos em todas infeções causadas por microrganismos ESBL positivos mesmo tendo sido registada a suscetibilidade a outros beta-lactâmicos *in vitro* (Vardakas et al.,

2012; Tamma et al., 2017). Se a estirpe em causa produz carbapenemases o tratamento é restrito a ceftazidima/avibactam, colistina, polomixina B, fosfomicina intravenosa, aztreonam, aminoglicosídeos e tigeciclina (Bader et al., 2016). Um estudo recente mostrou a eficácia de uso de uma nova combinação de ceftazidima/avibactam recomendado contra *Enterobacteriaceae* produtoras de betalactamases incluindo ESBL, AmpC, KPC e MDR *Pseudomonas aeruginosa* sendo a eficácia da ceftazidima/avibactam comparável com a eficácia do imipenem/cilastina (70,4% para 71,4%) no tratamento de ITU complicadas (Sharma et al., 2016). As ITU causadas por *P. aeruginosa* MDR poderão ser tratadas com fluoroquinolonas, ceftazidima, cefepima, piperacilina/tazobactam, carbapenemos, ceftazidima/avibactam, ceftolozam/tazobactam e aminoglicosídeos (Bader et al., 2016). Piperacilina/tazobactam é um antibiótico de espectro largo ativo contra *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas spp.* Quando se observa a combinação de vários tipos de resistência às várias classes de antibióticos as opções terapêuticas são limitadas aos aminoglicosídeos, à colistina e à tigeciclina (Falagas et al., 2014; Alexander et al., 2012; Bader et al., 2016).

Se as ITU são causadas por bactérias Gram-positivas ou fungos, o tratamento é distinto. Assim, os fármacos da primeira linha no tratamento de cistites causadas por VRE são ampicilina, nitrofurantoína, fosfomicina, doxiciclina. Por outro lado, em ITU superior ou ITU com bacteriémia são o linezolid e a daptomicina enquanto nos casos específicos quando há poucas opções do tratamento podem ser administradas as quino-, dalfopristina e a tigeciclina (Heintz et al., 2010). É necessário referir ainda que somente *E. faecium* são suscetíveis às estreptograminas enquanto os outros enterecocos geralmente não são suscetíveis à quino- e dalfopristina (Jones et al., 1998). As ITU causadas por *Staphylococcus aureus* são tratadas segundo TSA preferencialmente com os beta-lactâmicos. Em ITU não complicadas causadas por MRSA podem ser utilizados os fármacos orais seguintes: fosfomicina (Patwardhan & Singh, 2017) nitrofurantoína, trimetoprim/cotrimoxazol, tetraciclina enquanto em ITU complicadas os glicopeptídeos (Walsh, 1999) ou daptomicina (Wagenlehner et al., 2005). Nos casos de ITU associadas aos fungos são utilizados fluconazol e anfotericina B.

5.1. Tratamento empírico de ITU em Portugal.

Os antibióticos beta-lactâmicos e quinolonas, utilizados empiricamente para o tratamento de ITU são as classes de antibióticos que causam maior preocupação devido à tendência decrescente da suscetibilidade a estes fármacos por uropatógenos (Lee et al., 2011; Nordman et al., 2011; Spadafino et al., 2014). Em Portugal saiu uma diretiva da

DGS (NP nº 015/2011) que incentivou a restrição do uso de quinolonas e cotrimoxazol, e propôs a utilização de outras classes de antibióticos como a primeira linha no tratamento de ITU, tais como β -lactâmicos, fosfomicina e nitrofurantoína, em ITU não complicadas e nas grávidas (com exceção da nitrofurantoína), cefalosporinas (ceftriaxona e cefuroxima-acetil) no caso de pielonefrites ligeiras e moderadas, ceftriaxone nos casos graves, e levoflaxicina e gentamicina nos casos moderados e graves de pielonefrite nos doentes intolerantes aos β -lactâmicos (Anexo II).

6. Microrganismos causadores de ITU

6.1. Causadores de ITU da família *Enterobacteriaceae*

Maioria de ITU são causadas por representantes da família de *Enterobacteriaceae* que é constituída de um grupo diversificado de bacilos de Gram-negativo, não esporulados, anaeróbios facultativos, oxidase negativos, catálase positivos, fermentadores de glucose e nitrato-redutores (Bailey & Scott, 2014; Barroso et al., 2013). A maioria das espécies causadoras de ITU desta família são habitantes normais do trato gastrointestinal e são patógenos oportunistas, tal como *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, *Serratia spp.* que são capazes de causar as infeções em determinadas condições e em alguns hospedeiros. Algumas estirpes mais virulentas são patógenos primários, tal como UPEC - *E. coli (uropathogenic E. coli)* uropatogénica (Bailey & Scott, 2014).

6.1.1. *Escherichia coli*

Estudos epidemiológicos mostram que o agente infeccioso mais comum de ITU não complicados nos doentes ambulatoriais é *Escherichia coli* (Figura 4), uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* habitante comensal do trato gastrointestinal (Foxman et al., 2014; Terlizzi et al., 2017). Normalmente, UPEC é um fenótipo que causa infeções urinárias devido a presença dos seguintes fatores de virulência: *FimH*, fímbrias que permitem a aderência e a defesa da fagocitose, os flagelos que permitem o movimento e invasão ascendente, os sideróforos que permitem a acumulação de ferro, a alfa-hemolisina que permite a formação de poros e o fator citotóxico necrotizante que altera o citoesqueleto das (Nguyen et al., 2012). Portanto, só as bactérias possuidoras de vários fatores de virulência conseguem invadir o trato urinário por via ascendente, aderir

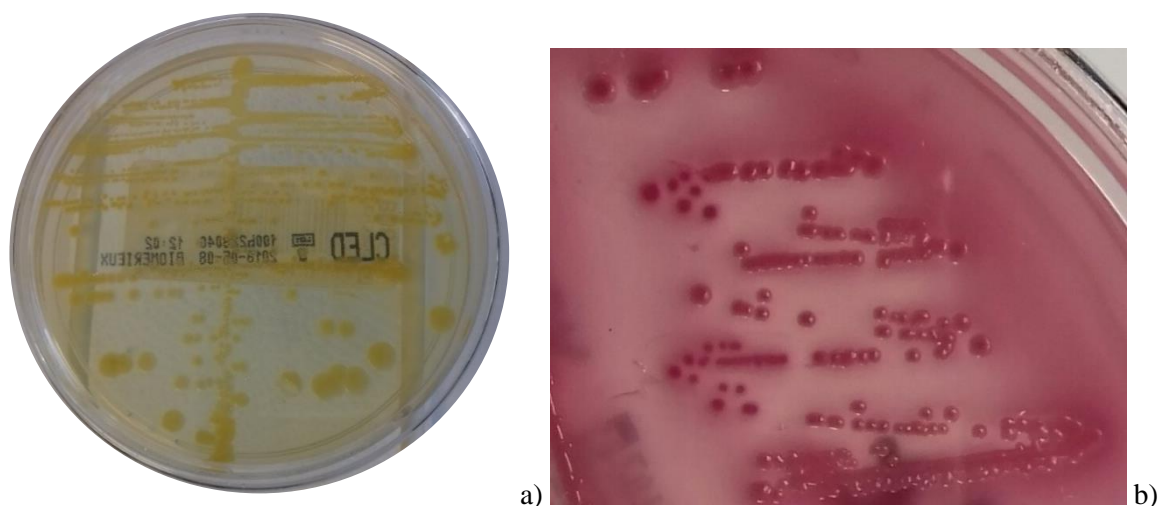


Figura 4. Colônias de *E. coli* no meio CLED (a) e em agar MacConkey (b)

eficazmente ao epitélio, invadir as células e causar uma infecção. Para a prevenção de ITU por UPEC podem ser utilizados tratamentos alternativos, tal como é a administração de vacinas, probióticos, estrógenos, vitamina D (Terlizzi et al., 2017).

6.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

O segundo agente infeccioso mais comum encontrado em ITU é *Klebsiella pneumoniae* (Figura 5), com maior prevalência em doentes internados (Barroso et al., 2013; Bailey & Scott, 2014). É um outro representante de família *Enterobacteriaceae* e uma causa frequente de ITU nosocomiais e surtos hospitalares (Christian et al., 2010). Possui antígeno capsular K que codifica a produção de uma cápsula extracelular, que

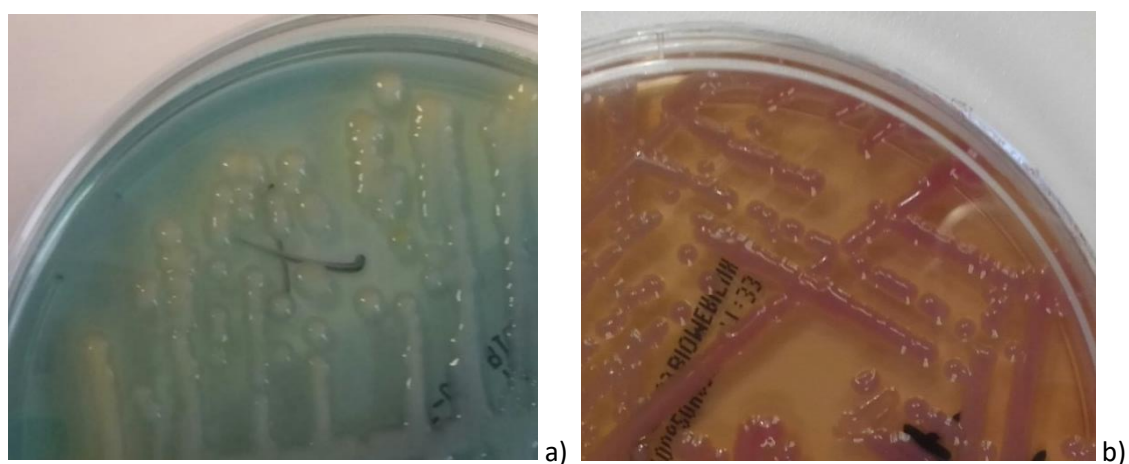


Figura 5. Colônias de *K. pneumoniae* no meio CLED (a) e em agar MacConkey (b)

protege a bactéria de defesas do hospedeiro e permite formar os biofilmes (Barroso et al., 2013). Ainda produz fímbrias que permitem a adesão eficaz ao epitélio urinário. A persistência de estirpes selecionadas endêmicas durante períodos longos de tempo leva à hipótese de que a transmissão ocorre devido ao contato entre pacientes e pessoal de saúde

hospitalar (Christian et al., 2010). Frequentemente é produtora de betalactamases de tipo ESBL ou KPC, o que limita as opções do tratamento.

6.1.3. *Proteus spp.*

ITU por *P. mirabilis*, normalmente, estão associados a cateterização prolongada ou anormalidades estruturais do trato urinário (Burall et al., 2004). *P. mirabilis* é uma bactéria móvel que exhibe “swarming” na maioria dos meios utilizados no exame bacteriológico de urina (EBU) exceto em agar de cistina lactose deficiente em electrólitos (CLED) que inibe a sua mobilidade e possibilita o isolamento de outros microrganismos da urina (Belas et al., 1998). “Swarming” é um processo cíclico que se deve à diferenciação em células alongadas multinucleadas, altamente flageladas e à capacidade para o movimento conjunto após o contacto com as superfícies que se pensa ser regulado pelo RsbA (*Regulator of swarming behavior*) receptor. Durante a diferenciação em células hiperflageladas aptas para “swarming”, *P. mirabilis* aumenta a expressão da hemolisina *HpmA*, uma toxina formadora de poros e *ZapA* metaloprotéase que cliva as imunoglobulinas IgG e IgA do hospedeiro (Fraser et al., 2002; Walker et al., 1999). A capacidade para a formação de “swarming” nas superfícies sólidas e mucosas permite às bactérias ascenderem rapidamente à uretra e invadirem a bexiga e os rins levando a complicadas infeções (Carey et al., 2013; Alisson et al., 1992). Essas infeções podem levar à formação de cálculos na bexiga e renais que são impenetráveis para os antibióticos. Ainda que raramente, podem levar a infeções sistémicas com um índice de mortalidade de 20-50% (Esposito et al., 1980). A formação de cálculos deve-se à alcalinização da urina devido à transformação de ureia em amónia por ação da urease (Jones et al. 1988).

6.2. Outras bactérias Gram-negativas causadoras de ITU

6.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Um outro agente infeccioso causador de ITU é *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa aeróbia, oxidase positiva, da família *Pseudomonadaceae*, ubíqua no ambiente, inclusive o ambiente hospitalar, e por isso é um agente infeccioso oportunista comum causador de IACS nos doentes imunodeprimidos ou com queimaduras (Patrick, 2005). Estudos epidemiológicos mostram que, a par de *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* é um segundo agente causador de ITU associados a cateterização (Weiner et al., 2016). UTI nosocomiais por *P. aeruginosa*, também estão associadas, para além da cateterização, a outra instrumentação do sistema urinário, prostatites crónicas, nefrolitíases e a terapia antimicrobiana prévia (Mittal et al., 2009). A resistência adquirida

desta bactéria deve-se às mutações cromossômicas que levam à desregulação nas bombas de efluxo que promovem a expulsão de antibióticos, às alterações nas AmpC que alargam o espectro da afinidade para a maior quantidade de substratos, às alterações na permeabilidade membranar que limitam a entrada de antibióticos e as alterações dos alvos dos antibióticos (Poole et al., 2011). A THG permite a aquisição de betalactamases, carbapenemases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e metilação de 16S RNA que levam à panresistência. A habilidade de formar biofilmes ricos em alginato *in vivo*, também, contribui para a resistência à terapia antimicrobiana (Gonçalves et al., 2017).

6.2.2. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii é um microrganismo ubíquo, proveniente do solo que sobrevive bem no meio hospitalar e a soluções desinfetantes (Peleg et al., 2008), podendo colonizar o equipamento médico ou utentes. Durante algum tempo foi considerado um microrganismo oportunista de patogenicidade duvidosa de fácil tratamento (Fournier et al., 2006), no entanto depois do surgimento de muitos surtos causados por estirpes XDR tornou-se um patógeno de alta importância (Lolans et al., 2006). Este microrganismo possui a habilidade de formação de biofilmes e capacidade de aderência eficaz (Pour et al., 2011) sendo um causador problemático de IACS com mau prognóstico (Djordjevic et al., 2013).

6.3. ITU causadas por bactérias Gram-positivas

6.3.1. *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus spp. são as bactérias Gram-positivas em forma de cocos agrupados e são habitantes comensais da pele. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria coagulase positiva, que pode fazer beta hemólise e essas características explicam a sua maior virulência em comparação com as outras bactérias deste género (Bailey & Scott, 2014). Os fenótipos com resistência à oxacilina e à vancomicina – MRSA e VRSA, respetivamente, são considerados multirresistentes. A sequenciação do genoma completo de MRSA mostrou a presença de ilhas de patogenicidade que codificam para várias entero-, exotoxinas, leucotoxinas e leucocidinas ausentes em *S. epidermidis* resistente à metilina (Gill et al., 2005). A resistência de MRSA aos beta-lactâmicos deve-se à alteração na estrutura de PBP2a codificada pelos genes *mecA* e *mecC* e confere à bactéria resistência a todos os beta-lactâmicos incluindo cefalosporinas e carbapenemos (Ballhausen et al., 2014). Estes genes estão localizados nos SCC*mec* (*staphylococcal cassette chromosome*) que são elementos genéticos móveis facilmente transmissíveis através da THG (Katayama et al., 2000). Alguns estudos referem a diminuição da

virulência de MRSA em comparação com o tipo selvagem devido à expressão de genes *mecA* e à interferência na expressão de gene regulador *agr* do sistema de *quórum sensing* (Rudkin et al., 2012). Atualmente os glicopeptídeos são fármacos de último recurso no tratamento de infecções por MRSA (Walsh, 1999). O primeiro caso da resistência aos glicopeptídeos foi registado num doente portador de VRE sendo que a resistência podia ter sido adquirida através da THG (CDC, 2002). Estudos mostram que a resistência à vancomicina pode desenvolver-se devido à exposição a uma dose subletal do antibiótico que leva ao stress oxidativo e à produção de espécies ativas de oxigênio que protegem a bactéria (Li et al., 2015). A resistência combinada aos macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B (MLSB) deve-se à expressão de genes *ermA* e *ermC* (*erythromycine ribosomal methylase*) que levam a modificação no local da ligação do fármaco ao ribossoma e à impossibilidade da inibição da síntese das proteínas (Aydeniz Ozansoy et al., 2015). Um outro tipo de resistência aos macrólidos e estreptogramina B deve-se a expressão do gene *mrsA* (*specific methionine sulfoxide reductase*) o que resulta num efluxo ativo das drogas. Outra espécie a referir é *Staphylococcus saprophyticus* que causa muito raramente ITU nos idosos (Miotla et al., 2017), mas é causa frequente de ITU nas mulheres jovens (Jhora & Paul, 2011).

6.3.2. *Enterococcus spp.*

Enterecocos são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, anaeróbios facultativos habitantes comensais do trato gastrointestinal que pertencem ao grupo de bactérias ácido lácticas e produzem bacteriocinas ou enterocinas, os peptídeos antibacterianos ativos contra as bactérias Gram-positivas (Park et al., 2003). Há algum tempo atrás não eram considerados patógenos por possuírem virulência baixa, no entanto, devido ao surgimento de vários casos de infecções sistémicas associados aos cuidados de saúde e utilização de dispositivos invasivos nos indivíduos submetidos a internamentos e tratamentos prolongados, passaram a ser um patógeno a considerar (Fisher & Philips, 2009). A capacidade de formação de biofilmes é fundamental no desencadeamento de ITU, endocardites e infecções endodônticas. Pensa-se que os genes *esp* e *ebp* genes regulam a formação de biofilmes e promovem adesão, colonização e evasão. Um outro fator de virulência importante é a produção das enzimas hidrolíticas como hialuronidase, gelatinase e serina protéase, que promovem a destruição de tecidos do hospedeiro e à produção de uma toxina citolisina responsável pela hemólise. A situação agrava-se, ainda, devido à presença da resistência intrínseca (Magiorakos et al., 2011; EUCAST, 2016) às cefalosporinas, macrólidos, aminoglicosídeos, colistina, sulfonamidas, comumente

encontradas em *E. faecium* e *E. faecalis* e à facilidade de transferência horizontal de genes de RA entre outras espécies. Assim, pensa-se que a THG *vanA* de *E. faecalis* conferiu a resistência aos glicopeptídeos a *S. aureus* quando as duas estirpes infetaram a mesma úlcera num doente (CDC, 2002).

6.4. Fungos

As ITU são raramente causadas por fungos (Fisher et al., 1982; Toner et al., 2016a). *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada e é um fungo leveduriforme. Estes fungos são representantes de flora polimicrobiana normal do trato genital e gastrointestinal, e são encontrados em 40-60% dos indivíduos saudáveis. A diabetes, tratamentos com antibióticos e corticosteroides, idade avançada, instrumentação, género feminino, nefrolitíase, transplantes renais, bacteriúria concomitante e as alterações fisiológicas são alguns dos exemplos de fatores de predisposição para uma infecção por fungos (Fisher et al., 1982; Fisher et al., 2011).

7. Prevenção e controlo de resistência aos antibióticos

Para monitorizar e controlar a disseminação de estirpes MDR foram adoptadas várias medidas de intervenção a nível mundial, internacional e nacional. Um avanço importante nesse sentido é o desenvolvimento de um plano nacional de combate à resistência em todos os países e a colaboração internacional na implementação de um Plano de Ação Global Sobre a Resistência aos Antimicrobianos (*Global Action Plan On Antimicrobial Resistance*) entre estados membros (WHO, 2015). Esse plano foi desenvolvido pela WHO e inclui cinco objetivos importantes: 1) sensibilizar a compreensão do perigo de resistências através de comunicação, formação e treinamento; 2) fortalecer o conhecimento e bases evidentes sobre vigilância e pesquisa científica; 3) reduzir a incidência de infeções através de saneamento eficaz, higiene adequada e medidas preventivas; 4) otimizar o uso de agentes antimicrobianos na saúde humana e animal; 5) aumentar os investimentos para sustentar o desenvolvimento de novos medicamentos, métodos de diagnóstico e vacinas.

Atualmente, na UE funciona um sistema europeu de vigilância epidemiológica de resistência aos antimicrobianos (EARSS) a nível internacional e nacional que monitoriza a suscetibilidade aos antibióticos, e tem um papel fundamental na escolha do tratamento empírico, na política de uso diferencial de antibióticos nos utentes em ambulatório e internados, no controlo da infeção, na monitorização das bactérias MDR e na

identificação de epidemias e resistências emergentes (Cornaglia et al., 2012). O recente lançamento da base de dados EARS-net pelo ECDC permite a consulta de todos os dados do EARSS desde 1999.

Devido ao aumento contínuo de IACS e de resistência aos antibióticos em Portugal foi implementado um Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA) que é constituído pelos três pilares seguintes: PAPA – Programa de Assistência à Prescrição Antibiótica, que incentiva o uso racional de antibióticos, CNPBCI – Companhia Nacional das Precauções Básicas do Controlo de Infecção (NP n° 029/2012, de 29 de dezembro), que tem como alvo a prevenção e controlo da incidência e transmissão da infeção através de boas práticas de higiene, e Vigilância Epidemiológica, que avalia o sucesso de componentes anteriores na redução de IACS e de resistência aos antibióticos (PPCIRA, 2017). Assim, os profissionais de saúde são incentivados a prescrever os antibióticos só em casos fundamentados por evidências clínicas e exames bacteriológicos, e os pacientes são encorajados a controlar bem as doses e duração de tratamento. O isolamento de pacientes infetados ou colonizados por MDR e boas práticas de higiene, tal como uma simples lavagem das mãos antes e depois de observações e tratamentos de vários pacientes, permite evitar a contaminação cruzada entre pacientes e profissionais de saúde por estirpes MDR. Por outro lado, o controlo epidemiológico permite avaliar as medidas implementadas e introduzir correções se estes não levam aos resultados esperados. Assim, o PPCIRA é um programa dinâmico que não somente alerta para problema de RA, mas é, também, um sistema que consiste na implementação, controlo e correção contínuos das medidas supracitadas.

II. Objetivos

Objetivos

Tendo em conta que a resistência aos antibióticos tem aumentado continuamente durante as últimas décadas, devido ao uso excessivo de antibacterianos e a adaptação de bactérias na presença destes fármacos, a necessidade da monitorização de incidência de estirpes multirresistentes é de elevada importância nos dias de hoje. De modo a contribuir para a resolução deste problema foi desenvolvida esta tese de mestrado que tem seguintes objetivos principais:

- Recolher os dados demográficos da prevalência de estirpes recolhidas de amostras de urina no Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV, Aveiro) no primeiro semestre de 2018
- Avaliar a prevalência destas estirpes nos vários serviços hospitalares, nas várias faixas etárias, nos géneros feminino e masculino
- Identificar as espécies bacterianas mais prevalentes nas amostras de urina
- Registrar a frequência de estirpes MDR nos isolados de urina
- Analisar o perfil da resistência aos antibacterianos nas estirpes isoladas

III. Material e métodos

Material e métodos

1. Local e período da colheita de amostras

O estudo da epidemiologia de estirpes multirresistentes, recolhidas de amostras de urina efetuou-se na secção de Microbiologia, do serviço da Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro (CHBV), em Aveiro. Neste estudo foram avaliadas as amostras de urina com pedido de EBU, num período de seis meses entre janeiro e julho de 2018.

2. Colheita e registo das amostras

Para efetuar um EBU deve recolher-se a primeira urina da manhã devido à maior concentração de bactérias ou de, pelo menos, 4 horas após a última micção (Bailey & Scott, 2014). As amostras de urina de jato médio, punção vesical ou algália destinadas a ensaios microbiológicos foram recolhidas para recipientes próprios e assinalados com os códigos de barras correspondentes aos utentes. No caso de impossibilidade de transporte rápido as amostras foram acondicionadas com solução de borato de sódio.

3. Avaliação de parâmetros bioquímicos da urina e o exame citológico

Avaliação bioquímica com tiras impregnadas com os vários substratos efetuou-se no equipamento automático Aution MaxTM AX-4280. Com este equipamento foi possível identificar os parâmetros bioquímicos e citológicos, tal como o valor de pH, presença e concentração de glucose, proteínas, sangue, leucócitos, cetonas, bilirrubina, urobilirrubina e nitratos (Zaman et al., 2001). Para confirmação da presença das células de sangue na urina efetuou-se o exame citológico. A piúria ou leucocitúria considerou-se quando foi possível a observar de mais de 5 leucócitos por campo (10x40) o que corresponde a 10⁴ leucócitos por 1 mL da urina.

Para isolamento de bactérias das amostras de urina foi utilizado o meio CLED que permite o crescimento de bactérias aeróbias, aeróbias facultativas, Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, e ainda inibe “swarming” de *P. mirabilis*. Depois, se for necessário, as colónias das bactérias Gram-negativas foram repicadas para agar *MacConkey* (*BioMérieux*), as bactérias Gram-positivas para os meio COS - agar Columbia com sangue de carneiro, PVX - agar chocolate *PolyViteX* (*BioMérieux*) e fungos para SCG2 - Gelose *Sabouraud* com Cloranfenicol e Gentamicina.

4. Coloração de Gram

Esfregaços das estripes isoladas com morfologia duvidosa foram corados pela técnica de Gram num equipamento PREVI^(R) Color Gram de modo a identificar a presença de bacilos de Gram-negativo ou cocos de Gram-positivos de importância clínica.

5. Identificação e TSA das estripes causadoras de ITU

Depois de isolamento das estirpes procedeu-se a sua identificação taxonómica e ao teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) no equipamento Vitek 2 (*BioMérieux*). Para identificação e TSA foram utilizadas as cartas Vitek^(R) 2 GN, Vitek^(R) 2 AST-N354 e Vitek^(R) 2 AST-N355 para isolados Gram-negativos. As cartas Vitek^(R) 2 GP e Vitek^(R) 2 AST-P 648 foram utilizadas nos isolados Gram-positivos, para identificação e antibiograma, respetivamente. Para preparação de inóculo efetuou-se a suspensão com densidade entre 0,5 e 0,65 na escala de *MacFarland* para isolados Gram-negativos e Gram-positivos, e cerca de 2 para fungos.

6. Detecção de ESBL pelo Vitek 2

Antibióticos impregnados nas cartas Vitek^(R) 2 AST-N354 permitem a deteção a produção de ESBL, mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos. Assim, a presença de ESBL é detetada por avaliação de perfil da suscetibilidade aos antibióticos seguintes: cefotaxima (0,5µg/ml), ceftazidima (0,5 µg/ml), cefepima (1 µg/ml) associadas e não associadas com o ácido clavulânico em concentração de 4 µg/ml, de 4 µg/ml e 10 µg/ml, respetivamente. No entanto, nos resultados ESBL negativos quando se observou a resistência às cefalosporinas de várias gerações procedeu-se a sua confirmação posterior por E-test segundo as recomendações da EUCAST (Giske et al., 2017).

7. Métodos da confirmação da presença de resistência a ANB

7.1. Confirmação da presença de carbapenemases

Para diferenciar a produção de carbapenemases de outros mecanismos de resistência aos carbapenemos procedeu-se ao teste carba NP (*BioMérieux*), segundo a indicações do fabricante e interpretação segundo as regras EUCAST (EUCAST, 2018). Preparou-se a suspensão de isolado segundo a densidade do padrão e introduziu-se num poço da placa do teste contendo uma preparação de carbapenemo e de indicador de pH. A degradação destes carbapenemos por estripes produtoras de carbapenemases foi detetada devido a alteração de pH de meio e da cor da suspensão. As estirpes que alteraram a cor padrão para laranja ou amarelo consideraram-se estirpes produtoras de carbapenemases.

7.2. Teste de susceptibilidade à colistina

Devido às limitações do Vitek 2 na avaliação da resistência /suscetibilidade à colistina, recomenda-se a sua confirmação por outros métodos, tal como o teste de gradiente de concentração. Assim, para confirmação da susceptibilidade da colistina recorreu-se ao teste de microdiluição em caldo com kit *Micronaut* segundo das recomendações da EUCAST (EUCAST, 2016). Brevemente, preparou-se a suspensão bacteriana com densidade de 0.5 na escala de MacFarland (DENSIMAT, *BioMérieux*) e 50 uL desta foram inoculados em 11,5 mL de meio líquido. Seguidamente, 100 uL da suspensão obtida foram inoculados nos poços com as várias concentrações de colistina. A leitura de resultados efetuou-se após incubação a 37°C, durante 24 horas.

7.3. Confirmação da presença de ESBL

A confirmação da presença de ESBL efetuou-se pelo método E-test. Para efeito as tiras de E-test (*BioMérieux*) de Ceftazidima/Ceftazidima+Ácido Clavulânico e Cefotaxima/Cefotaxima+Ácido Clavulânico, cefepima/cefepima+ Ácido Clavulânico de acordo com as instruções do fabricante. Sendo a razão ≥ 8 entre concentração inibitória mínima (MIC) para ANB e ANB associado ao inibidor de betalactamases, considerou-se indicativa da presença de ESBL de acordo com as recomendações da EUCAST (Giske et al., 2017; EUCAST, 2018).

7.4. Confirmação da presença de PBP2a

A deteção prévia da presença de PBP2a nos isolados bacterianos de Gram-positivo com morfologia correspondente a estafilococos efetuou-se via ensaio imunocromotográfico com fragmentos (rFabs) de anticorpos monoclonais recombinantes de alta sensibilidade (AlereTM PBP2a SA *Culture Colony Test*).

8. Base de dados

A base de dados para estudo foi criada a partir de dados registados em Appolo 3, Vitek 2 e documentação de registo de EBU recorrendo ao *software Excel*. Os dados reunidos incluíram as variáveis seguintes: idade, género, número de código de barras, data do registo, serviço de atendimento, microrganismo isolado, mecanismo de resistência, a presença de multirresistência, perfil de suscetibilidade aos vários antibióticos. A seleção de estirpes multirresistentes efetuou-se segundo os critérios descritos em (Magiorakos et al., 2011; Cornaglia et al., 2012) e a informação sobre resistência intrínseca disponibilizada pelo EUCAST (Leclercq et al., 2011, atualizado em versão 3.1 de 26 de setembro de 2016). Para avaliação de dados considerou-se somente um resultado positivo

por paciente independentemente de quantidade de pedidos feitos sendo que os duplicados no intervalo de até 7 dias foram eliminados.

9. Tratamento estatístico de dados

O tratamento de dados efetuou-se com o *software Excel* e os métodos da estatística descritiva. Foram determinadas as frequências absoluta e relativa de casos de ITU positivos dependendo da faixa etária, género, serviço e agente infeccioso, e desvios padrão da média respetivos.

IV. Resultados e discussão

Resultados e discussão

Neste trabalho foram avaliadas 5433 amostras de urina com pedido de identificação bacteriológica que deram entrada no HIP num período de 1 de janeiro de 2018 até 30 de junho de 2018. Da totalidade de pedidos de EBU por esse período cerca de 25% (1482) foram positivas. Da totalidade de amostras de urina positivas foram isolados 1289 estirpes bacterianas.

1. Caracterização geral da população

1.1. Estratificação de estirpes isoladas por faixas etárias e género

Durante a análise das amostras positivas para no EBU registaram-se 420 casos positivos em doentes do sexo masculino e 869 em doentes do sexo feminino. A distribuição de estirpes isoladas nas várias faixas etárias entre dois géneros está apresentada na Figura 6.

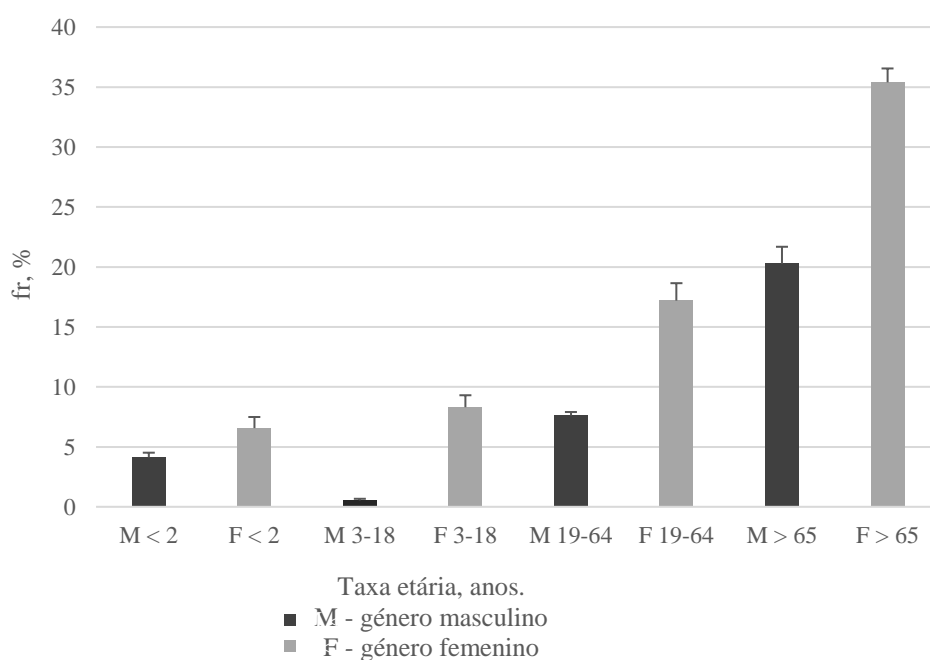


Figura 6. Distribuição de estirpes isoladas por faixas etárias e género

Em todas as faixas etárias foi observada uma maior prevalência de ITU no género feminino em comparação com o género masculino. Esses resultados são esperados e encontram-se em concordância com outros estudos epidemiológicos (Silva, 2008; Bailey & Scott, 2014). O género feminino é mais propício à ocorrência de ITU devido ao menor

comprimento da uretra e à proximidade da uretra aos órgãos genitais e ânus, o que leva a uma maior probabilidade de contaminação por flora comensal.

A estratificação de estirpes isoladas pelas várias faixas etárias permite concluir que a sua prevalência é elevada nas crianças até dois anos de idade, descendo na faixa etária de 3 a 18 anos, aumentando com idade ≥ 19 anos e chegando ao seu máximo após os 65 anos de idade. As ITU são as infecções mais comuns registadas nas crianças pequenas, como descrito no estudo de Roberts *et al*, onde cerca de 4.1 % de crianças de ≤ 2 anos de idade com febre tinham ITU (Roberts et al., 1983). Um outro estudo avaliou a prevalência de ITU nas crianças com doença aguda, onde cerca de 7.3 % das crianças avaliadas, com idade até 3 anos, tinham ITU. O mesmo estudo indica que foi estimado que cerca de 50-80 % de ITU podem não chegar a ser diagnosticadas segundo os “guidelines” aplicados na prática clínica (O’Brien et al., 2013).

No presente estudo a maior quantidade de estirpes isoladas (55.7 %) registou-se nos pacientes com idade ≥ 65 anos. Estes resultados estão em concordância com os outros estudos descritos na literatura científica (Rowe & Juthani-Mehta, 2014). De fato, nessa faixa etária as pessoas têm muitas doenças crónicas, tomam muita medicação e podem apresentar diminuição das defesas imunitárias do organismo o que leva ao aumento das infecções urinárias. Na literatura científica, o aumento da incidência de ITU nessa faixa etária está associado ao declínio de estrogénio, atrofia da mucosa vaginal, alteração de microbiota vaginal nas mulheres e a obstrução do trato urinário devido ao aumento de próstata nos homens (Arinzon et al., 2011; Rowe & Juthani-Mehta M, 2013; Mody & Luthani-Mehta, 2014; Miotla et al., 2017). Por outro lado, observa-se que no sexo masculino, na faixa etária de 3 a 18 anos, a incidência de ITU é muito baixa constituindo 0.6 % de todas as ITU.

1.2. Estratificação de isolados por serviços e géneros

Relativamente à estratificação de isolados por serviços e géneros foi observada a seguinte distribuição de estirpes recolhidas de amostras de urina: 801 (62.1 %) foram provenientes de urgências, 335 (26.0 %) de internamento, 153 (11.9 %) de outros serviços hospitalares. Portanto, um maior número de isolados provinha do serviço de urgência onde existe a maior efluência dos utentes. A distribuição geral de estirpes recolhidas de amostras de urina registada nos vários serviços de CHBV está apresentada na Figura 7.

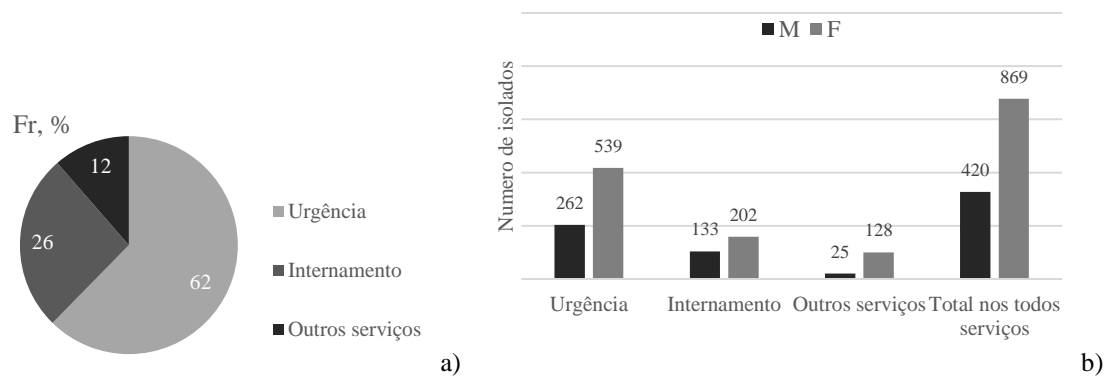


Figura 7. Distribuição de isolados entre os serviços hospitalares (a) e em ambos os gêneros (b)

Quando a esta distribuição adicionamos os dados da distribuição por gênero, nos mesmos serviços, verificou-se que no serviço de urgência, cerca de 539 (67.3 %) de casos de isolamento ocorreram no gênero feminino e 262 (32.7 %) no gênero masculino, 202 (60.3%) de casos no sexo feminino e 133 (39.7 %) no sexo masculino, no serviço de internamento, 128 (83.7 %) de casos no sexo feminino e 25 (16.3 %) no sexo masculino nos outros serviços. Portanto, registou-se um maior número de isolados no sexo feminino em comparação com o sexo masculino em todos serviços, no entanto, a diferença de número isolados entre gêneros é menor no serviço de internamento quando comparado com o serviço de urgência e com outros serviços. Este resultado é esperado e reflete a maior incidência de ITU não complicadas nas mulheres (Silva, 2008; Bailey & Scott, 2014). No serviço de internamento, a prevalência de ITU é associada a outras comorbidades ou ITU complicadas, e tem prevalência semelhante nos homens e mulheres.

1.3. Espécies isoladas

Os microrganismos mais isolados da urina foram bactérias Gram-negativas (n=1021, 79.2 %) dos quais são da família *Enterobacteriaceae* (n=1014, 78.7 %) e isolados em menor quantidade as bactérias Gram-positivas (n=153, 11.9 %) e fungos (n=48, 3.7 %). Os resultados obtidos estão de acordo com os que tinham sido observados em estudos anteriores Tabela 1 (Roxo, 2015; Magalhães et al., 2014; Soares, 2013). Da análise dos

Tabela 1. Percentagens das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas

Estudo	Ano	Critérios da seleção de amostras	Número total de isolados	Gram-negativos, %	Gram-positivos, %	Fungos, %
Soares, 2013	2012	≥ 65 anos (urgência)	424	88	7.3	4.7
Magalhaes et al., 2014	2013	≥ 65 anos (urgência)	540	88.7	5.4	5.9

Roxo, 2015	2013-2014	≥ 65 anos (urgência)	1263	86	8	6
Presente estudo	2018 (1º semestre)	≥ 65 anos (urgência)	378	86.1	9.7	4.3
Presente estudo	2018 (1º semestre)	Todas faixas etárias e todos serviços hospitalares	1289	79.2	11.9	3.7

dados obtidos, durante este estudo, relativamente às espécies predominantes foi possível verificar que as nove espécies mais prevalentes foram: *E. coli* (53.9 %), *K. pneumoniae* (12.4 %), *P. mirabilis* (6.3 %), *P. aeruginosa* (5.3 %), *E. faecalis* (4.5 %), *S. saprophyticus* (3.1 %), *S. aureus* (1.5 %), *E. faecium* (1.4 %) e *C. albicans* (2.1 %) (Figura 8). Foram ainda isoladas estirpes de outras 25 espécies em que cada uma representa menos de 1% de casos de ITU: *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Enterobacter spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus spp.*, *Providencia stuartii*, *Acinetobacter baumannii*, *Raoultella planticola*, *Candida spp.*

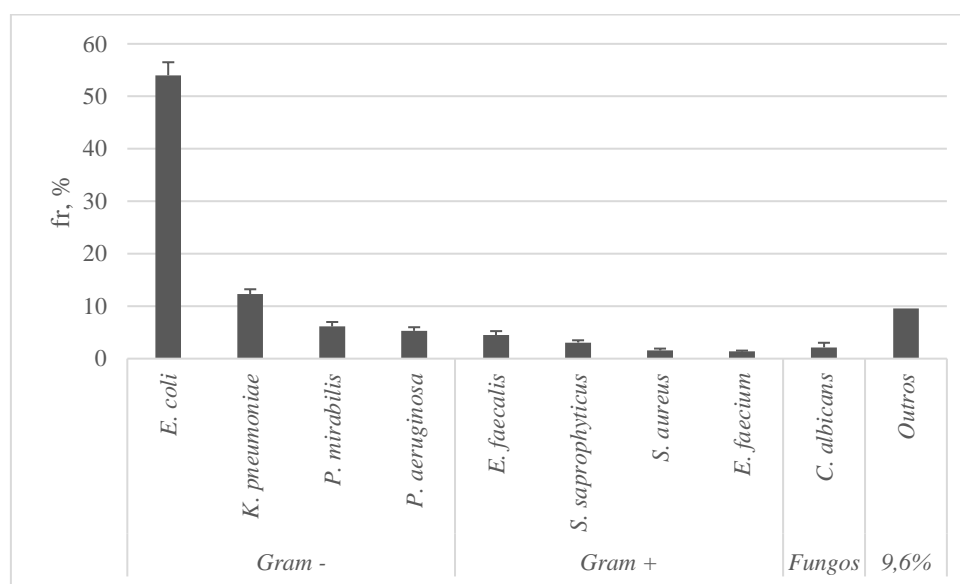


Figura 8. Espécies recolhidas de amostras de urina mais prevalentes

No presente estudo observou-se uma quantidade ligeiramente maior de bactérias de Gram-positivo, com prevalência de *E. faecalis*. (n=58), dos quais 45 estirpes pertenciam a pacientes com idade ≥ 65 anos e 11 estirpes a pacientes com idade compreendida entre 34 a 64 anos. O segundo representante de bactérias de Gram-positivo mais prevalente é *S. saprophyticus*. Normalmente, *S. aureus* é a espécie mais virulenta que causa infeções e é mais a isolada de *Staphylococcus spp.* No entanto, espécie *S. saprophyticus* causa frequentemente ITU não complicadas nas mulheres jovens embora tenha sido considerada uma bactéria contaminante até aos anos 1960 (Jhora & Paul, 2011). Assim, neste estudo

38 das 40 estirpes, foram isoladas de pacientes do género feminino e 35 destas estirpes pertenciam as meninas e mulheres jovens de 11 a 52 anos de idade. O gráfico da Figura 9 ilustra o comportamento do número de isolamentos em pacientes do género feminino versus o género masculino, para cada uma das espécies mais prevalentes.

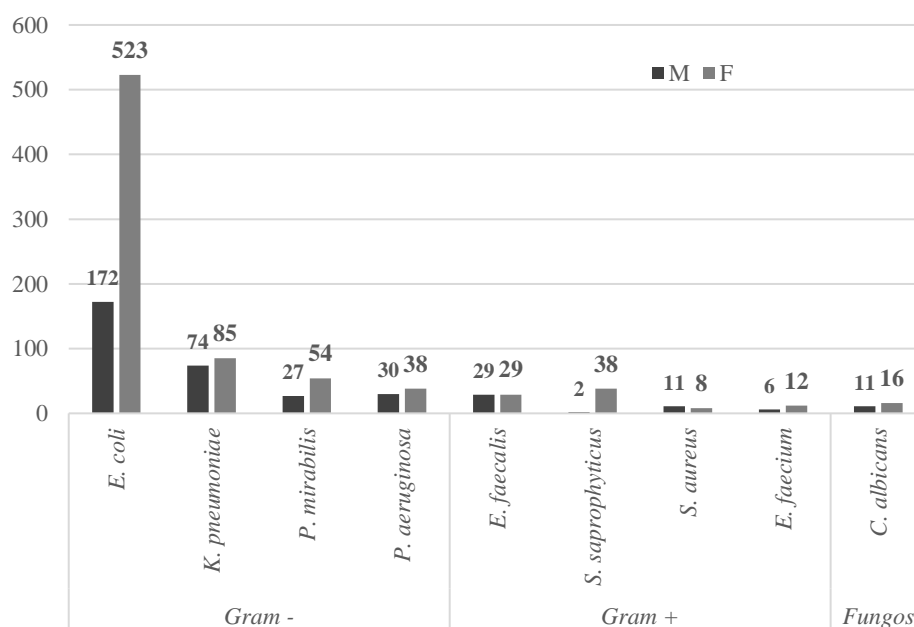


Figura 9. Distribuição de isolados mais prevalentes nos géneros feminino e masculino

Como podemos observar na Figura 9, não há grandes diferenças na quantidade de espécies isoladas nos dois géneros, exceto de *E. coli* e de *S. saprophyticus* que são mais frequentes causadores de ITU não complicadas nas mulheres (Mehnert-Kay SA. 2005; Jhora & Paul, 2011). Normalmente, os homens têm ITU graves associadas a outros problemas de saúde que podem ser provocadas por várias bactérias oportunistas (Silva, 2008; Bailey & Scott, 2014).

No período do estudo foram isoladas 140 estirpes das oito espécies seguintes, em crianças até 2 anos: *E. coli* (n=122, 86.5 %), *Proteus mirabilis* (n=7, 5.3 %), *Klebsiella pneumoniae* (n=4, 3.5 %), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3, 2.3 %) e 1 *Citrobacter koseri*, 1 *Proteus vulgaris*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Serratia marcescens*. Podemos ainda observar que poucas espécies foram isoladas de crianças até dois anos e as mais prevalentes nessa faixa etária são bactérias de Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, com predominância de *E. coli*. e *P. mirabilis*. A prevalência de ITU causadas por *E. coli* e *P. mirabilis* é frequente nas crianças até cinco anos (Schlager, 2001; Ronald, 2002).

Na faixa etária de 3 a 18 anos foram isoladas 112 estirpes das oito espécies seguintes: *E. coli* (n=77, 68.8 %), *Staphylococcus saprophyticus* (n=19, 17.0 %), *Proteus mirabilis* (n=9, 8.0 %), *Klebsiella pneumoniae* (n=2, 1.8 %), *Enterococcus faecalis* (n=2, 1.8 %), 1 estirpe *C. kozeri*, 1 de *S. epidermidis*, 1 de *S. hominis*. Podemos observar que estirpes mais prevalentes nessa faixa etária, constituída maioritariamente por jovens do género feminino (Figura 6), são *E. coli*, *S. saprophyticus* e *P. mirabilis*. Na literatura científica também descrevem a prevalência destas estirpes causadoras de ITU nessa faixa etária (Mehnert-Kay SA. 2005; Jhora & Paul, 2011).

Na faixa etária de 18 a 64 anos foram isoladas as seguintes espécies mais prevalentes: *E. coli* (n=200, 61.7 %), *Klebsiella pneumoniae* (n=32, 9.9 %), *Proteus mirabilis* (n=22, 6.8 %), *Staphylococcus saprophyticus* (n=19, 5.9 %), *Enterococcus faecalis* (n=11, 3.4 %), *P. aeruginosa* (n=7, 2.2 %), *E. aerogenes* (n=6, 2.0 %), *S. aureus* (n=4, 1.2 %) e mais 18 outras espécies. Segunda espécie mais isolada é *K. pneumoniae*. Nessa faixa etária, tal como na anterior a espécie *S. saprophyticus* continua a ser um isolado mais predominante das bactérias de Gram-positivo (Mehnert-Kay SA. 2005; Jhora & Paul, 2011). Por outro lado, em pacientes de 18 a 64 anos de idade são isoladas espécies que não tinham estado presentes nas faixas etárias anteriores: *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* (exceto de 3 casos de ITU na faixa etária ≤ 2 anos), *E. aerogenes*, *S. aureus* e muitas outras espécies oportunistas.

Na faixa etária de ≥ 65 anos foram isoladas as seguintes espécies mais prevalentes: *E. coli* (n=296, 41.5 %), *Klebsiella pneumoniae* (n=121, 17.0 %), *P. aeruginosa* (n=58, 8.1 %), *Enterococcus faecalis* (n=45, 6.3 %), *Proteus mirabilis* (n=43, 6.0 %), *Candida albicans* (n=27, 3.8 %), *Enterococcus faecium* (n=17, 2.4 %), *S. aureus* (n=15, 2.1 %), *E. aerogenes* (n=10, 1.4 %), *P. stuartii* (n=10, 1.4 %) e 22 outras espécies. Nos estudos anteriores realizados durante 2012-2014, *E. coli* e *K. pneumoniae* tinham sido as espécies isoladas mais prevalentes, com excepção do ano de 2011 quando foi observada a prevalência de *K. pneumoniae* nos pacientes ≥ 65 anos atendidos no serviço da urgência no CHBV (Roxo et al., 2015). De 2012 a 2014 a quantidade de *E. coli* isolada destes doentes estava a aumentar continuamente sendo que os resultados obtidos em 2014 (46.8 % de *E. coli*, 15.1 % de *K. pneumoniae*) são semelhantes a presente estudo (48.1 % de *E. coli*, 15.6 % de *K. pneumoniae* em 2018) e 61.5 % de *E. coli* 9.6 % de *K. pneumoniae* no serviço da urgência em todas as faixas etárias em 2018. Como podemos observar a terceira espécie mais prevalente nessa faixa etária é *P. aeruginosa*. Também, se observa o aumento da quantidade de *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, o aparecimento de novas

espécies isoladas, *Candida albicans*, *Enterococcus faecium*, *P. stuartii*, e a diminuição de *S. saprophyticus* (n=2).

Portanto, com o avanço da idade aumenta a quantidade de espécies oportunistas isoladas que normalmente não causam ITU nos pacientes saudáveis. Essas espécies emergem como causadores de ITU complicadas nos pacientes com doenças metabólicas, imunológicas, anatómicas ou nos pacientes de idades pediátricas (Ronald, 2002). Por exemplo, no presente estudo *C. albicans* foi isolada em pacientes com idade ≥ 70 anos. Os vários estudos mostram que a candidúria afeta pacientes submetidos a antibioterapia prolongada, cateterização ou que sinaliza outros problemas de saúde mais graves (Sobel et al., 2000). Os pacientes com diabetes podem adquirir com maior facilidade ITU causadas por *E. coli*, *Candida spp.*, *K. pneumoniae*, streptococos e enterococos, ao passo que nos pacientes cateterizados *E. coli*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Enterobacter* e *S. aureus* são mais prevalentes (Ronald, 2002).

1.4. Estratificação de estirpes isoladas por tipo de amostra

Da totalidade de amostras de urina positivas 85.4 % (n=1266) foram recolhidas por jato médio (JM), 2.4 % (n=36) por punção vesical (PV) e 12.2 % (n=180) por algália (ALG). Após de eliminação de amostras duplicadas observou-se a seguinte distribuição de isolados recolhidos por vários métodos (Tabela 1): 32 estirpes de PV, 169 de ALG, 1088 de JM.

Da totalidade de amostras colhidas por punção vesical, em 64% foi obtido um resultado positivo no EBU. Distribuindo os resultados positivos por serviços verificou-se que 24 de 32 estirpes isoladas de amostras de PV foram recolhidas na urgência de pediatria (uma amostra da consulta externa de pediatria), em crianças com menos de 12 meses, sendo 22 *E. coli* e 2 *K. pneumoniae*. As oito amostras restantes provenientes de indivíduos de outras faixas etárias continham oito estirpes de espécies diferentes, sem prevalência nenhuma. Não houve amostras de PV nos pacientes de 1 a 40 anos.

Da totalidade de amostras da algália, em 35% foi obtido um resultado positivo no EBU. Verificou-se que 56 das 169 estirpes isoladas em amostras de algália pertenciam a crianças até 2 anos, tendo as amostras sido colhidas no serviço de urgência de pediatria. Nessa faixa etária observou-se a prevalência de *E. coli* (53 de 56 isolados de ALG) enquanto nas amostras de ALG de outras faixas etárias a fração de *E. coli* era muito menor (34 estirpes de *E. coli* de 113 estirpes isolados das todas amostras de ALG das

Tabela 2. A distribuição de isolados mais prevalentes nos vários tipos de amostras

	JM (n=1088)	ALG (n=169)	PV (n=32)
Microorganismos isolados mais prevalentes (ordem decrescente)	<i>E. coli</i> (n=585) <i>K. pneumoniae</i> (n=130) <i>P. mirabilis</i> (n=72) <i>P. aeruginosa</i> (n=53) <i>E. faecalis</i> (n=51) <i>S. saprophyticus</i> (n=40) <i>C. albicans</i> (n=20) <i>S. aureus</i> (n=17) <i>E. faecium</i> (n=13) <i>E. aerogenes</i> (n=13) <i>C. koseri</i> (n=12) <i>P. stuartii</i> (n=11)	<i>E. coli</i> (n=87) <i>K. pneumoniae</i> (n=27) <i>P. aeruginosa</i> (n=16) <i>P. mirabilis</i> (n=8) <i>E. faecalis</i> (n=6) <i>C. albicans</i> (n=6) <i>E. faecium</i> (n=4) <i>E. aerogenes</i> (n=3)	<i>E. coli</i> (n=24) <i>K. pneumoniae</i> (n=3) <i>P. mirabilis</i> (n=1) <i>E. faecalis</i> (n=1) <i>C. albicans</i> (n=1) <i>E. faecium</i> (n=1) <i>S. aureus</i> (n=1)
Faixas etárias sem amostras	-	2-26 anos	1-40 anos

outras faixas etárias). Relativamente à distribuição noutras faixas etárias verificou-se que 23 das 169 estirpes isoladas das amostras de algália pertenciam aos adultos de 26 a 64 anos, e 91 estirpes a pacientes com idade ≥ 65 anos. Não houve nenhuma amostra deste tipo nos pacientes de 2 a 26 anos. Foram ainda isoladas seguintes espécies das amostras de algália:

- 27 estirpes de *K. pneumoniae*: 7 estirpes em pacientes de sexo masculino, de 55 a 64 anos de idade, e 20 estirpes dos pacientes com ≥ 65 anos de idade, 12 pertencentes ao sexo feminino e 8 ao sexo masculino.

- 16 estirpes de *P. aeruginosa* das quais três estirpes pertenciam a indivíduos pertencentes à faixa etária de 44 a 64 anos de idade, 12 estirpes a pacientes com idade ≥ 65 anos e uma estirpe a um bebé de 16 meses. Na distribuição por géneros nove estirpes foram isoladas de pacientes do sexo masculino e sete do sexo feminino;

- oito estirpes de *P. mirabilis* das quais duas estirpes foram isoladas de crianças até até dois anos, uma estirpe de um indivíduo de 64 anos e cinco estirpes de pacientes com idade ≥ 65 anos. Na distribuição por géneros quatro estirpes foram isoladas de pacientes do sexo feminino e quatro estirpes de pacientes do sexo masculino;

- seis estirpes de *C. albicans* isoladas pacientes com idade ≥ 75 anos, sendo que duas foram isoladas em pacientes do sexo feminino e quatro do sexo masculino;

- seis estirpes de *E. faecalis*, onde cinco estirpes foram isoladas de pacientes com idade ≥ 65 anos, sendo dois pertencentes ao sexo feminino e três pertencentes ao sexo masculino, e uma de mulher de 55 anos de idade;

- as quatro estirpes de *E. faecium* foram isoladas de pacientes com idade ≥ 82 anos, pertencendo três ao sexo feminino e uma ao sexo masculino.

Tendo em conta a totalidade de amostras colhidas por jato médio, em 23 % foi obtido um resultado positivo no EBU. Sempre que o mesmo doente teve pedidos simultâneos de EBU por diferentes métodos de colheita, nomeadamente, jato médio, algália ou punção vesical, o resultado do jato médio foi excluído. Assim, foram isoladas 1088 estirpes de amostras de urina por jato médio dos quais 585 foram positivos para *E. coli*, 130 para *K. pneumoniae*, 72 para *P. mirabilis*, 53 para *P. aeruginosa*, 51 para *E. faecalis*, 40 para *S. saprophyticus*, 20 para *C. albicans*, 17 para *S. aureus*, 13 para *E. aerogenes*, 13 para *E. faecium* e outros.

A estratificação por tipo de amostra permite perceber que a maior parte das amostras colhidas por PV pertence a crianças até 2 anos. Cerca de 1/3 de amostras colhidas por algália, também pertence a essa faixa etária. O uso de algália e mesmo PV são métodos de recolha da urina usados nessa faixa etária devido as dificuldades de obtenção de amostras de JM. As restantes amostras recolhidas por esses dois métodos pertencem maioritariamente a indivíduos de faixas etárias avançadas. Doentes onde seja necessário recolher urina recorrendo a ALG normalmente são dependentes ou têm outras comorbidades.

Outra observação é a ausência de *S. saprophyticus* nas amostras de ALG e PV, e uma incidência muito reduzida de *S. aureus* nas amostras de ALG (n=1) e PV (n=1). Este fato pode ser relacionado com menor contaminação destas amostras com flora comensal em comparação com amostras colhidas por JM. De fato, muitos isolados de *Staphylococcus spp.* isolados são contaminantes o que dificulta o diagnóstico. Contudo, *S. saprophyticus* frequentemente causa ITU não complicadas nas mulheres jovens saudáveis que normalmente não recorrem a colheita por PV e ALG (Jhora & Paul, 2011).

Observou-se a prevalência de *E. coli* (122 de 140 estirpes totais) como principal microrganismo isolado em crianças até dois anos de idade, em amostras recolhidas por PV (22/24), ALG (53/56) e JM (47/60), o que é esperado nessa faixa etária (Schlager, 2001; Ronald 2002). Não foram isoladas as bactérias Gram-positivas, provavelmente, devido ao fato de a maior parte de amostras (80 de 140) terem sido recolhidas por PV (24) ou algália (56), o que provavelmente reduziu a possibilidade de contaminação da urina com a flora comensal Gram-positiva em comparação com a recolha por JM (60). Por outro lado, as bactérias oportunistas, normalmente, causam ITU nos pacientes com outras comorbidades nas idades avançadas (Ronald 2002).

1.5. Estratificação de isolados mais prevalentes de *E. coli* e *K. pneumoniae* pelos serviços hospitalares e gênero

A distribuição de estirpes mais prevalentes (*E. coli*, *K. pneumoniae*) nos vários serviços de CHBV está apresentada na Figura 10. Da análise dos resultados obtidos foi

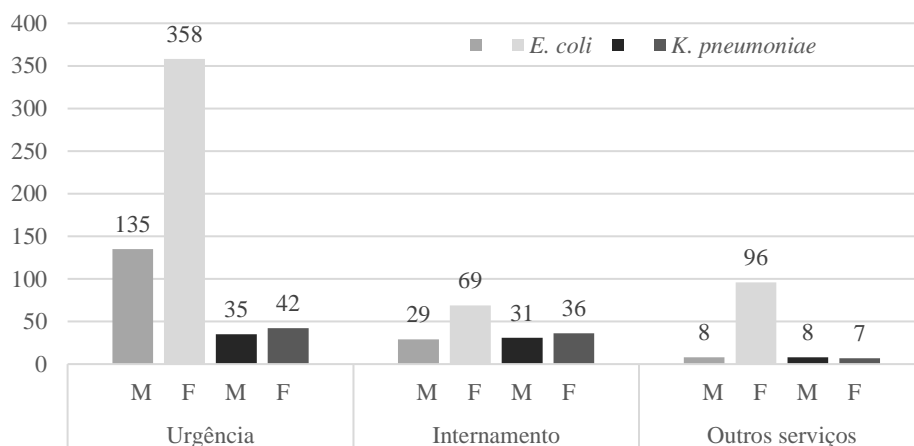


Figura 10. Número de *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras de urina positivas para EBU nos vários serviços hospitalares em ambos os gêneros: F – gênero feminino; M – gênero masculino

possível observar que a prevalência de *E. coli* é muito maior no serviço de urgência em comparação com o serviço de internamento, enquanto que o número de estirpes de *K. pneumoniae* é semelhante em ambos os serviços. Assim, nos doentes de “outros serviços” e do serviço de Urgência, isolados causadas por *E. coli* são mais prevalentes (68.6 % e 61.5 %, respetivamente) especialmente nas mulheres (75.2 % e 66.4 %) em comparação com doentes internados (constituem 29.6 % de todos isolados – 21.8 % no gênero feminino e 31.2 % no gênero masculino). Isso pode estar relacionado com a maior prevalência de ITU não complicadas causadas por *E. coli* em pacientes que recorrem ao serviço de urgência e “outros serviços”. Esses dados correlacionam com os resultados de outros estudos que disponibilizam os dados seguintes: nos doentes de ambulatório *E. coli* causa cerca 75-90% de ITU enquanto nos doentes internados pode chegar até 21-54% (Hickerson & Carson, 2006).

2. Caracterização geral de estirpes MDR isoladas

Da totalidade de estirpes isoladas, 326 (25.5 %) foram identificadas como MDR, estirpes resistentes a pelo menos um antibiótico de três classes distintas. As estirpes isoladas, mais prevalentes, estão apresentadas na Tabela 3. Das 124 estirpes de outras espécies de bactérias isoladas, 29 % eram MDR.

Tabela 3. Estirpes multirresistentes isoladas de amostras de urina

	Total de isolados		Isolados MDR		ESBL		CPE		ESBL+CP E		XDR		MRSA/ OxaR	
	Fa	Fr, %	Fa	Fr,%	Fa	Fr, %	Fa	Fr, %	Fa	Fr, %	Fa	Fr, %	Fa	Fr, %
Todos isolados	1289	-	326	25.3	136									
<i>E. coli</i>	695	53.9	124	17.8	62	8.9	1							
<i>K. pneumoniae</i>	159	12.3	97	61.0	74	46.5	10	6.3	2	1.3				
<i>P. mirabilis</i>	81	6.3	14	17.3										
<i>P. aeruginosa</i>	68	5.3	25	36.8							11(7*)	16.2		
<i>E. faecalis</i>	58	4.5	-											
<i>S. saprophyticus</i>	40	3.1	3	7.5									11	27.5
<i>S. aureus</i>	19	1.5	11	58.0									10	52.6
<i>E. faecium</i>	18	1.4	16	89.0										
<i>C. albicans</i>	27	2.1	-	-										
Outros 25 especies	124	9.6	36	29.1										

*só sensível a colistina

OxaR – resistente a oxacilina

A distribuição de estirpes MDR pelos serviços de urgência e internamento está apresentado na Figura 11:

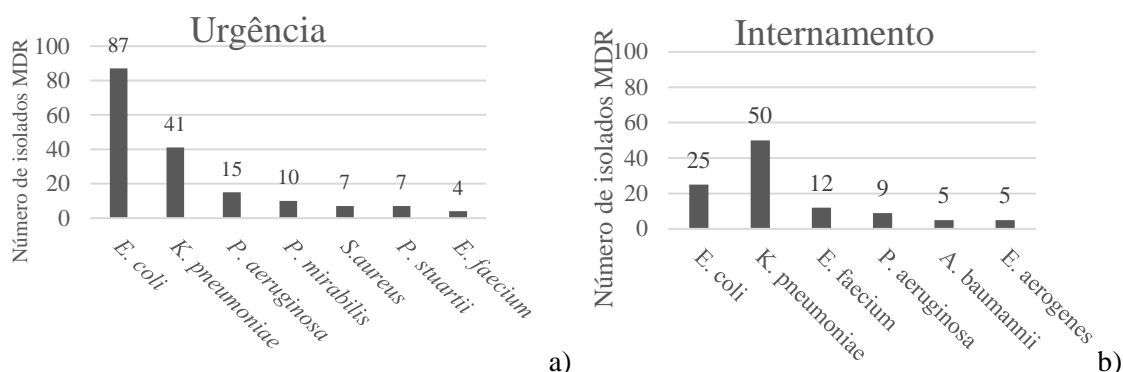


Figura 11. Número de estirpes MDR isoladas nos serviços de urgência (a) e internamento (b)

Como podemos observar na Figura 11 as estirpes MDR mais prevalentes isoladas em doentes do serviço da urgência são: *E. coli* (n=87), *K. pneumoniae* (n=41), *P. aeruginosa* (n=15), *P. mirabilis* (n=10), *S. aureus* (n=7), *P. stuartii* (n=7), enquanto no internamento são: *K. pneumoniae* (n=50), *E. coli* (n=25), *E. faecium* (n=12), *P. aeruginosa* (n=9), *A. baumannii* (n=5). Embora tenha sido isolado um maior número de estirpes de *E. coli*, quando comparado com o número de estirpes de *K. pneumoniae*, em ambos os serviços (Figura 10), as estirpes MDR mais prevalentes no internamento são da espécie *K. pneumoniae* (o dobro de *E. coli*).

2.1. Estratificação de estirpes MDR pelas várias faixas etárias

A distribuição de bactérias multirresistentes pelas várias faixas etárias está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição de estirpes multirresistentes isoladas pelas faixas etárias

Faixa etária, anos	Fa de todos isolados	Fa de isolados MDR	Fr, % de isolados MDR dentro de faixa etária respetiva	Fr, % de isolados MDR da totalidade de isolados MDR
≤ 2 anos	139	14	10.1	4.3
3-18	110	7	6.4	2.2
19-64	327	68	20.8	20.9
≥ 65	713	237	33.3	72.7
Total	1289	326	25.5	100

O percentil de bactérias multirresistentes tem tendência para aumentar nas faixas etárias avançadas (20.8 % em pacientes de 19 a 64 anos e 33.2 % em pacientes ≥ 65 anos) em comparação com crianças e jovens (10 % em pacientes ≤ 2 anos e 6 % em pacientes de 3 a 18 anos de idade). Observa-se ainda uma incidência maior de ITU causadas por estirpes MDR nos pacientes com idade ≥ 65 anos (Figura 12).

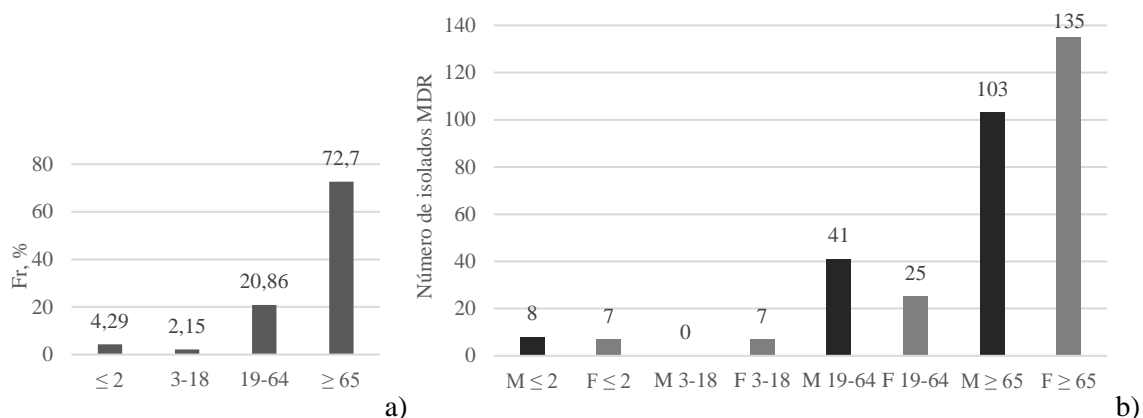


Figura 12. Emergência de isolados MDR nas várias faixas etárias: frequência relativa (%) de isolados MDR nas várias faixas etárias (a) e número absoluto de isolados MDR nas várias faixas etárias em ambos os gêneros (b): F – gênero feminino; M – gênero masculino

Das bactérias isoladas de crianças até dois anos ($n=140$) foram identificadas 14 estirpes MDR (10.5 %), todas de *E. coli* resistentes à combinação amoxicilina/clavulanato (Tabela 5). Destas estirpes seis foram produtoras de ESBL, das quais quatro detinham a resistência combinada à ciprofloxacina e à gentamicina, e duas ainda à amicacina. O perfil de resistência dos isolados MDR de crianças até dois anos está apresentada na Tabela 5.

Embora nessa faixa etária se observe menor percentagem de estirpes multirresistentes isoladas (10.5 % de isolados de *E. coli*) elas não podem ser subestimadas, pois algumas são produtoras de ESBL e têm poucas opções para o tratamento.

Tabela 5. Perfil da resistência nos isolados MDR das crianças até dois anos

Total de isolados	Fa de resistência aos antibacterianos					
	MDR	Amox/Clav	Pip/Taz	Gentamicina	Amicacina	Ciprofloxacina
14	14	6	10	3	8	9

2.2. Estratificação de estirpes MDR por tipo de amostra

A prevalência de estirpes MDR isoladas de vários tipos de amostras está apresentada na Figura 13.

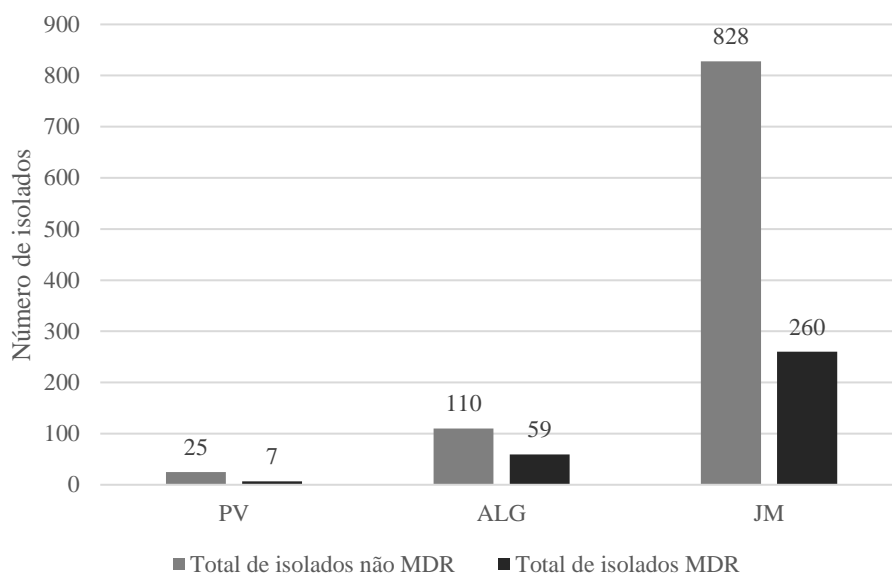


Figura 13. Número de estirpes não MDR e MDR isoladas de vários tipos de amostras

Como podemos observar um maior número de isolados MDR provinha de amostras de JM o que é esperado porque o maior número de amostras foi recolhido por este método (Figura 13). No entanto, as estirpes MDR têm maior prevalência (34.3 %) nas amostras de algália em comparação com amostras recolhidas por PV (21.9 %) e JM (23.9 %) (Tabela 6). Esse número sobe até 48.3 % nas amostras de algália e até 62.5 % nas amostras de PV se não se considerar as amostras de crianças até dois anos que frequentemente são recolhidas por estes dois métodos, mas têm baixa incidência de estirpes MDR.

Tabela 6. Frequencia relativa de estirpes MDR em amostras recolhidas por vários metodos

Tipo de amostra	Total MDR	
	Fa	Fr, %
PV (n=32)	7	21.9
ALG (n=169)	59	34.3
JM (n=1088)	260	23.9

Este resultado pode estar relacionado com a maior probabilidade de contaminação, de doentes algaliados, com bactérias multirresistentes provenientes do meio hospitalar (Safdar & Maki, 2002). Por outro lado, os doentes que não conseguem recolher urina por JM são mais debilitados por causa de outras comorbilidades ou tratamentos intensivos, apresentado uma defesa imunitária baixa, o que leva a infeções causadas por bactérias MDR oportunistas. De fato, a exposição a ANB é um factor que vários estudos associam ao risco de desenvolver resistência a ANB (Duin & Paterson, 2016; Karam et al., 2016). Os outros riscos são a imunossupressão devido ao transplante de órgãos ou presença de

outras comorbidades, que podem levar à colonização ou à infeção por bactérias MDR. Como podemos observar na Figura 14 a maior parte das estirpes MDR isoladas das amostras de algália e jato médio foram recolhidas de amostras de pacientes com idade \geq 65 anos o que é esperado devido ao aumento de existencia de factores de risco supracitados nesta faixa etária.

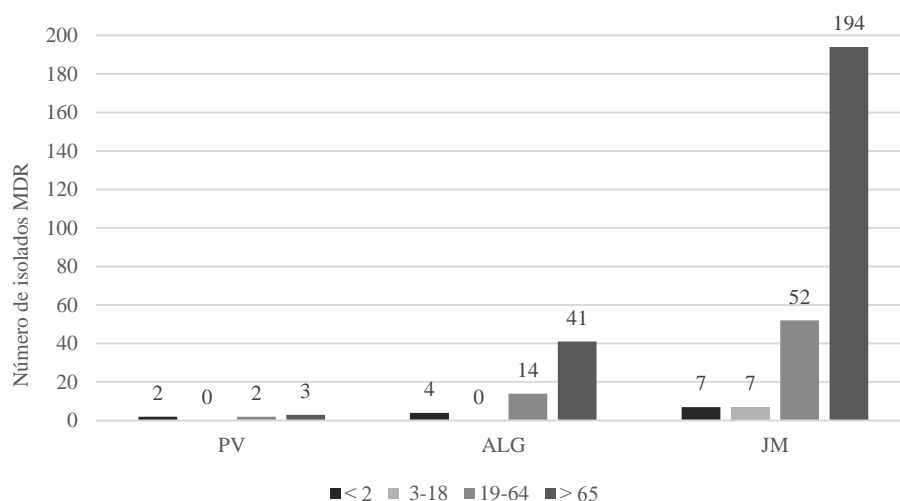


Figura 14. Número de estirpes MDR isoladas dos vários tipos de amostras nas várias faixas etárias

3. Caracterização de estirpes MDR de *E. coli* e *K. pneumoniae*

3.1 Estirpes MDR de *E. coli* e *K. pneumoniae*

Da totalidade de isolados de *E. coli* 17.8% foram MDR. Destes 8.9% são produtores de ESBL e uma estirpe de *E. coli* concluiu-se ser produtora de carbapenemase.

Da totalidade de isolados de *K. pneumoniae* 61.0% foram classificados como MDR, dos quais 46.5% das estirpes são produtoras de ESBL. Foram ainda isoladas 12 estirpes de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos, dez das quais produtoras de carbapenemases e duas produtoras de ESBL. Duas estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases foram ESBL positivas.

O número de isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* MDR nos dois géneros está apresentado no Tabela 7

Tabela 7. A distribuição de estirpes MDR de *K. pneumoniae* e *E. coli* entre géneros

Espécie	Total	Número de isolados no género feminino	Número de isolados no género masculino
<i>E. coli</i> MDR	124	74	49
<i>E. coli</i> ESBL	62	33	29
<i>K. pneumoniae</i> MDR	97	41	56
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	74	31	43

Como descrito na Tabela 7, o número de estirpes MDR de *E. coli* isolado de pacientes do género feminino é superior ao número de estirpes isoladas de pacientes do género masculino. Por outro lado, o número de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL é semelhante em ambos os géneros. Relativamente aos isolados de *K. pneumoniae*, observou-se a maior prevalência de isolados multirresistentes de *K. pneumoniae* no género masculino em comparação com o género feminino.

3.2 Estratificação de estirpes MDR de *E. coli* e *K. pneumoniae* pelas várias faixas etárias

A distribuição de isolados multirresistentes mais prevalentes pelas várias faixas etárias está apresentada na Tabela 8

Tabela 8. Distribuição de isolados multirresistentes de *E. coli* e *K. pneumoniae* nas várias faixas etárias

Bactéria	Total	≤ 2anos	3-18 anos	19-64 anos	≥ 65 anos
<i>K. pneumoniae</i> (todos os isolados)	159	4	2	32	121
<i>K. pneumoniae</i> MDR	97	0	1*	20 (50-64 anos)	76
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	74	0	1*	18 (54-64 anos)	55
<i>K. pneumoniae</i> CPE	10	0	0	1 (56 anos)	9
<i>E. coli</i> (todos isolados)	695	122	77	200	296
<i>E. coli</i> MDR	124	14	4	30	76
<i>E. coli</i> ESBL	62	6	1	13	42
<i>E. coli</i> CPE	1	0	0	1 (58 anos)	0

*1 amostra da menina de 4 anos ESBL+
CPE- carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Como podemos observar na Tabela 8, a maior parte das estirpes de *E. coli* foram isoladas de pacientes com idade ≥ 65 anos (n=296, 42.6 %) consequentemente, a maior prevalência de estirpes MDR e produtoras de ESBL de *E. coli*, foi registada em pacientes de faixas etárias avançadas. Como é possível verificar na Tabela 8, a prevalência de *E. coli* produtoras de ESBL é 6.5 % (13/200) em pacientes de 19 a 64 anos e 14.2 % (42/296) em pacientes com idade ≥ 65 anos. Este resultado é semelhante a estudos prévios os quais reportam 18 % de *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de amostras de urina em pacientes com ≥ 65 anos de idade atendidos no serviço de urgência de CHBV em 2014 (Roxo et al., 2015a).

Relativamente às estirpes de *K. pneumoniae*, a maioria foi isolada de pacientes com idade ≥ 65 anos (n=121, 75.8 %). Observou-se ainda que quase todos isolados de *K. pneumoniae* MDR (99.0 %), ESBL (98.7 %) e CPE (100%) foram obtidos de amostras de pacientes com idade ≥ 50 anos. De facto, a maior prevalência de *K. pneumoniae*

multirresistentes registou-se em pacientes com idade ≥ 65 anos: 76 estirpes MDR (62.8 % da totalidade de isolados de *K. pneumoniae* nesta faixa etária), 55 estirpes são produtoras de ESBL (45.5 %) e 9 estirpes são produtoras de carbapenemases (7.4 %). Este resultado é semelhante a estudos prévios, os quais reportam que, em 2014, a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL em ITU era de 44.1 % em pacientes com idade ≥ 65 anos (Roxo et al., 2015a).

3.3 Estratificação de estirpes MDR *E. coli* e *K. pneumoniae* pelos vários serviços hospitalares em ambos os géneros

A distribuição de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* multirresistentes pelos vários serviços de CHBV está apresentada na Figura 15.

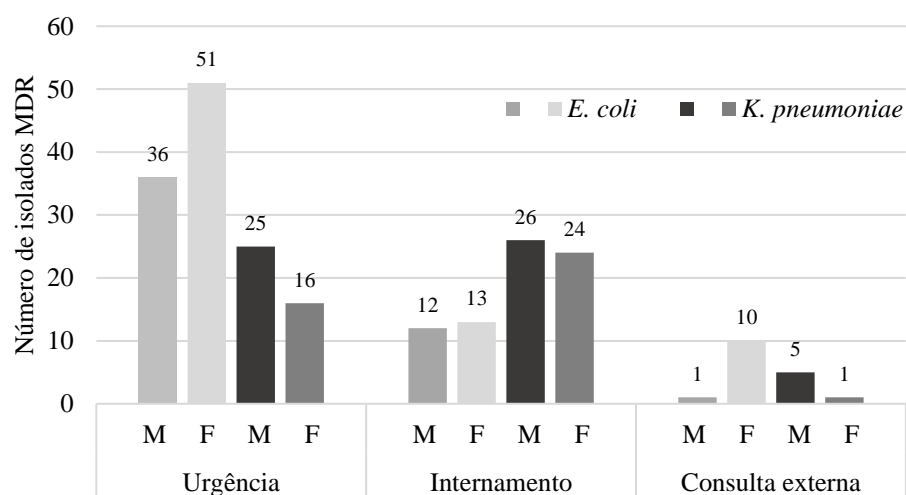


Figura 15. Número total de isolados MDR de *E. coli* e *K. pneumoniae* em amostras de urina positivas para EBU nos vários serviços hospitalares em ambos os géneros: F – género feminino; M – género masculino

Da análise da figura 15 podemos observar uma maior prevalência de estirpes MDR de *E. coli*, em pacientes do género feminino, relativamente às estirpes de *K. pneumoniae*, nos serviços de Urgência e outros serviços, exceto de internamento. No entanto, houve maior prevalência de *K. pneumoniae* MDR, em comparação com *E. coli* MDR, no serviço de internamento. Relativamente ao serviço de internamento, apesar de maior prevalência de isolados de *E. coli* no género feminino, em comparação com o género masculino (Figura 10), a prevalência de bactérias MDR de *E. coli* é semelhante em ambos os géneros. Como foi referido acima, este facto está relacionado com a maior incidência de ITU não complicadas no género feminino, enquanto as ITU complicadas frequentemente associadas aos patógenos MDR afetam ambos os géneros de modo igual (Ronald, 2002;

Silva, 2008; Bailey & Scott, 2014). A maior prevalência de estirpes MDR de *K. pneumoniae* isoladas no serviço de internamento pode estar relacionada com a origem hospitalar da infecção (Christian et al., 2010).

4. Outros isolados MDR recolhidos de amostras de urina

4.1. *Proteus mirabilis*

Segundo os resultados obtidos, a terceira espécie mais prevalente isolada de amostras de urina foi *P. mirabilis* (n=81, 6.3 %). Do total de estirpes isoladas, 14 (17.3 %) foram identificadas como MDR. A resistência aos ANB nos isolados não MDR e MDR de *P. mirabilis* está apresentada na Tabela 9.

P. mirabilis possui a resistência intrínseca aos vários ANB, tal como a penicilina G, oxacilina, tetraciclina, macrólides, lincosamidas, estreptograminas, glicopéptidos, rifampicina, ácido fusídico, nitrofurantoína e colistina o que diminui as opções para o tratamento da ITU (Stock, 2003). Para além da resistência intrínseca, se ainda possuir algum mecanismo de resistência adquirido poderá tornar-se um microrganismo, considerado “Alerta”, de difícil erradicação. No presente estudo observaram-se baixas taxas de resistência (7.1 %) a amicacina e piperacilina/tazobactam nos isolados MDR de *P. mirabilis* pelo que estes fármacos podem ser utilizados no tratamento de ITU causadas por esta bactéria.

Tabela 9. O perfil da resistência aos antibacterianos em isolados de *P. mirabilis*

Antibacteriano	Resistência em isolados de <i>P. mirabilis</i> não MDR, Fr (%)	Resistência em isolados de <i>P. mirabilis</i> MDR, Fr (%)
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	4/67 (6.0)	9/14 (64.3)
Piperacilina/Tazobactam	0	1/14 (7.1)
Gentamicina	3/67 (4.5)	7/14 (50.0)
Amicacina	0	1/14 (7.1)
Ciprofloxacina	11/67 (16.4)	13/14 (84.0)
Cotrimoxazol	10/67 (14.9)	10/14 (92.9)
Fosfomicina	9/67 (13.4)	8/14 (57.1)
Ertapenem	0	0

4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Durante este estudo foram isoladas 68 estirpes de *P. aeruginosa* das quais 25 (36.8 %) foram identificadas como MDR. Onze destes isolados verificou-se serem resistentes a todos antibióticos exceto a uma (sete estirpes sensíveis só a colistina) ou duas (quatro estirpes) classes, sendo assim classificados XDR. Os estudos prévios, também, registam alta taxa de sensibilidade de *P. aeruginosa* a colistina (Roxo et al., 2015b). Vários estudos

associam o fenótipo XDR com os surtos das infecções nosocomiais com alta taxa de mortalidade (Poole et al., 2011; Lambert et al., 2011). Em estudos prévios foi identificada resistência combinada a vários aminoglicosídeos e beta-lactâmicos mediada pelo integrão In99 localizado no cromossoma de isolados de *P. aeruginosa* isolados no CHBV (Caetano et al., 2006). *P. aeruginosa* possui resistência intrínseca às várias penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, quinolonas e cloranfenicol devido à reduzida permeabilidade da membrana exterior às drogas e a presença de bombas de efluxo eficazes (Patrick, 2005). No entanto, alguns representantes destas classes de ANB, nomeadamente, tobramicina e gentamicina, ticarcilina e ciprofloxacina têm eficácia comprovada contra a bactéria. (Bader et al., 2016). Assim, a piperacilina/tazobactam é um ANB de espectro largo ativo contra *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas spp.* Este antibiótico é uma opção empírica para o tratamento de ITU associadas a cateter e ITU adquiridas no hospital (Bader et al., 2016; Hoban et al., 2012), no entanto, segundo o CDC, cerca de 15% das estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de algália dos pacientes com ITU, nos EUA, entre 2011-2014 foram resistentes a esta combinação de fármacos (Weiner et al., 2016). No presente estudo, foi possível concluir que 57 de 60 (95 %) isolados testados apresentaram resistência à ticarcilina, portanto, essa opção não é viável para o tratamento empírico na nossa área geográfica. O resultado do TSA efetuado nas estirpes MDR e não MDR de *P. aeruginosa* está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. O perfil da resistência aos antibacterianos nos isolados de *P. aeruginosa*

Antibacteriano	Resistência nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> não MDR, Fr (%)	Resistência nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> MDR, Fr (%)
Piperacilina/Tazobactam	4/43 (9.3)	19/25 (76.0)
Gentamicina	1/43 (2.1)	14/25 (56.0)
Ciprofloxacina	3/43 (7.0)	21/25 (84.0)
Ceftazidima	0	19/25 (76.0)
Cefepima	0	14/25(56.0)
Colistina	0	0

Segundo os resultados obtidos o tratamento empírico pode ser ineficaz visto a resistência elevada a gentamicina (56.0 %), piperacilina/tazobactam (76.0 %) e ciprofloxacina (84.0 %) em estirpes MDR. Mesmo assim, estes fármacos podem ser utilizados no tratamento diferencial de UTI causadas por estas estirpes após a confirmação da sensibilidade a estes antibacterianos com TSA. A resistência elevada às cefalosporinas da terceira e quarta geração (Tabela 9) observada em estirpes MDR de *P. aeruginosa* limita ainda mais as poucas opções terapêuticas disponíveis.

4. 3. *Acinetobacter baumannii*

Durante o período destes estudos foram isoladas cinco estirpes de *A. baumannii* no serviço de internamento (Figura 14), todas MDR e resistentes aos carbapenemos e às fluoroquinolonas, duas estirpes produtoras de carbapenemases e uma estirpe XDR sensível somente à colistina. A incidência de isolados de *A. baumannii* somente no serviço de internamento (Figura 11) aponta a origem hospitalar da infeção. Vários estudos reportam o facto de esta bactéria ser frequentemente isolada em ambiente hospitalar e representando assim um problema para pacientes com sistema imunitário enfraquecido (Peleg et al., 2008; Magalhães et al., 2014). *A. baumannii* possui resistência intrínseca às cefalosporinas devido a produção de AmpC cromossómica e pode possuir resistência adquirida, mediada por plasmídeos, às várias classes de ANB. Em Portugal, segundo dados de ECDC de 2012 cerca de 64% dos isolados *Acinetobacter spp.* apresentaram resistência combinada aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenemos (ECDC de 2013). Apesar da incidência de ITU causadas por *A. baumannii* ser muito baixa o tratamento é muito problemático devido às elevadas taxas de resistência aos antibacterianos.

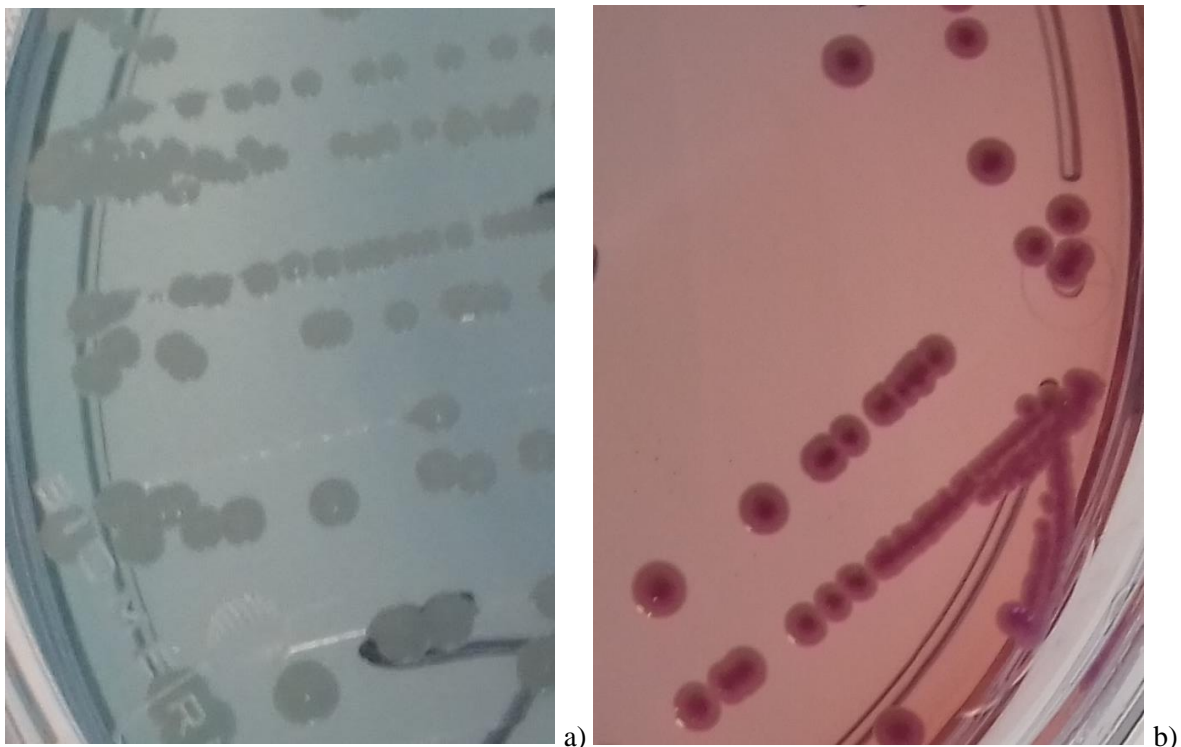


Figura 16. Colónias de *Acinetobacter baumannii* no meio CLED (a) e agar MacConkey (b)

4.4. *Staphylococcus spp.*

Durante o presente estudo foram isoladas 19 estirpes de *S. aureus*, dos quais 52.6 % apresentaram resistência à oxacilina, ou seja, são MRSA (Tabela 3) tendo a maior parte sido recolhida no serviço de urgência (Figura 9). Foram também isoladas 40 estirpes de *S. saprophyticus* das quais somente 3 foram MDR, no entanto 11 (27.5 %) foram resistentes a oxacilina. Portanto, o tratamento empírico destas estirpes com beta-lactâmicos pode ser comprometido (Pailhoriès et al., 2017).

Se até há algum tempo atrás a incidência de infeções por MRSA era mais associada a internamentos de longa duração em meio hospitalar, atualmente, a disseminação de MRSA na comunidade passou a ser também um grande problema (Stevens, 2003). Em Portugal, cerca de 50% de isolados invasivos de *S. aureus* são MRSA, e causam uma elevada taxa de óbitos (27%) em pacientes com bacteriémias provocadas por estas estirpes (Paiva et al., 2014).

As ITU causadas por *S. aureus* são tratadas, preferencialmente, com beta-lactâmicos, e sempre que possível com base no TSA. Em ITU não complicadas causadas por MRSA podem ser utilizados os seguintes fármacos orais: fosfomicina (Patwardhan & Singh, 2017) nitrofurantoína, trimetoprim/cotrimoxazol e tetraciclina. Enquanto que em ITU complicadas os glicopeptídeos (Walsh, 1999) ou daptomicina (Wagenlehner et al., 2005) serão mais indicados. No presente estudo, 100 % de *S. aureus* foram sensíveis ao cotrimoxazol e vancomicina, e 5.3 % à tetraciclina. Segundo dos resultados do programa SENTRY de 2006-2012, a utilização de cotrimoxazol mostrou-se eficaz contra 98.4 % de *S. aureus* testados, enquanto 52.2% e 40.8% de estirpes do mesmo conjunto foram resistentes a oxacilina e levofloxacina, respectivamente, pelo que este fármaco pode ser útil no tratamento de ITU causadas por MRSA (Sader et al., 2014).

4.5. *Enterococcus spp.*

Das espécies mais prevalentes de bactérias Gram-positivas isolada foram *E. faecalis* (4.5 %) e *E. faecium* (1.4 %). Do total de isolados de *E. faecium* 88.9 % foram classificados como sendo MDR. Da totalidade de isolados de *E. faecium* 94.5 % foram resistentes à levofloxacina e 88.9 % à ampicilina. Todos os isolados se revelaram sensíveis à vancomicina, havendo apenas um registo de resistência à teicoplanina. Nos isolados de *E. faecalis* somente um foi classificado como MDR e a taxa de resistência foi de 44.8 % e 50% à levofloxacina e gentamicina, respectivamente. A taxa de resistência à levofloxacina é muito alta, tendo este facto sido já reportado noutros estudos

epidemiológicos. Não houve nenhum registo da resistência à ampicilina ou à vancomicina. Portanto, não houve nenhum isolado identificado como sendo VRE. Segundo os resultados de monitorização de vigilância epidemiológica do estudo SENTRY de 2006-2012 registaram-se elevadas taxas de resistência de *Enterococcus spp.* à levofloxacina e à vancomicina, 32.2% e 4,4% para *E. faecalis* e 91.5% e 75.9% para *Enterococcus faecium*, respetivamente (Sader et al., 2014). Cerca de 14.7% de EBU num hospital em Cambridge, na Inglaterra, efetuados entre 2005-2014, acusaram a presença de *Enterococcus spp.* entre os quais 9.8% eram VRE (Toner et al., 2016b). Neste estudo registaram observou-se baixa sensibilidade à nitrofurantoína e à ampicilina nos isolados VRE de *E. faecium* (74% e 1%) em comparação com *E. faecalis* (100% e 87%). Por outro lado, a sensibilidade ao linezolid e à tigeciclina foi de cerca de 100% para ambas as espécies, sendo ainda referido que 51.2% de isolados de *E. faecium* eram VRE, enquanto para *E. faecalis* esse valor era 1.6 %. Nos anos 2013-2016, também se registou um aumento da taxa de resistência a vancomicina nos isolados *Enterococcus spp.* invasivos (EARS-Net, 2017). No entanto, o isolamento de VRE num EBU requer a diferenciação entre colonização, bacteriúria assintomática e ITU, e no caso de inexistência clínica dos sintomas de infeção num paciente este não necessita do tratamento antibacteriano (Zachary et al., 2001; Heintz et al., 2010). De fato, existem evidências que *Enterococcus spp.* inclusive VRE facilmente sobrevivem num ambiente hospitalar e nos dispositivos médicos podendo contaminar ou colonizar a pele e mucosas dos pacientes ou profissionais de saúde (Zachary et al., 2001; Oberoi & Aggarwal, 2010).

Os fármacos da primeira linha no tratamento de VRE, em cistites, são ampicilina, nitrofurantoína, fosfomicina e a doxiciclina. Em ITU superior ou ITU com bacteriémias as opções de tratamento são o linezolid e a daptomicina. Em casos específicos quando há poucas opções para o tratamento podem ser administradas a quino-, dalfopristina e a tigeciclina (Heintz et al., 2010). É necessário referir ainda que somente *E. faecium* são suscetíveis às estreptograminas, enquanto os outros enterecocos geralmente não são suscetíveis à quino- e dalfopristina (Jones et al., 1998). Cole et al., 2015 defendem o uso de aminopenicilinas no tratamento VRE em ITU devido à elevada concentração do fármaco na urina após uma única dose de amoxicilina, administrada oralmente, que se encontra muito acima de MIC90 para estirpes VRE resistentes a ampicilina.

4.6. *Candida spp.*

Foram isoladas um total de 48 (3.7 %) estirpes de *Candida spp.* de amostras de urina analisadas. Destas, quatro amostras foram isoladas de pacientes com idades entre 32 e 61

anos, as restantes foram isoladas de pacientes ≥ 70 anos de idade. Nove estirpes foram isoladas a partir de amostras recolhidas de ALG. *Candida albicans* é o segundo agente causador de ITU associadas a cateterização prolongada a seguir à *E. coli* (23.9% e 11.7%, respetivamente) (Weiner et al., 2016). ITU associados aos fungos são tratadas com fluconazol e anfotericina B (Colombo & Guimarães). No presente estudo não se registou nenhuma ocorrência de fungos multirresistentes, somente duas estirpes foram resistentes ao fluconazol e três à anfotericina B. No entanto, a resistência aos antifúngicos é um grande problema devido à existência de poucas opções terapêuticas (Wiederhold, 2017).

5. Perfil da resistência aos antibióticos nos isolados MDR

O perfil da resistência aos antibióticos das estirpes classificadas como MDR e não MDR está representado na Figura 17.

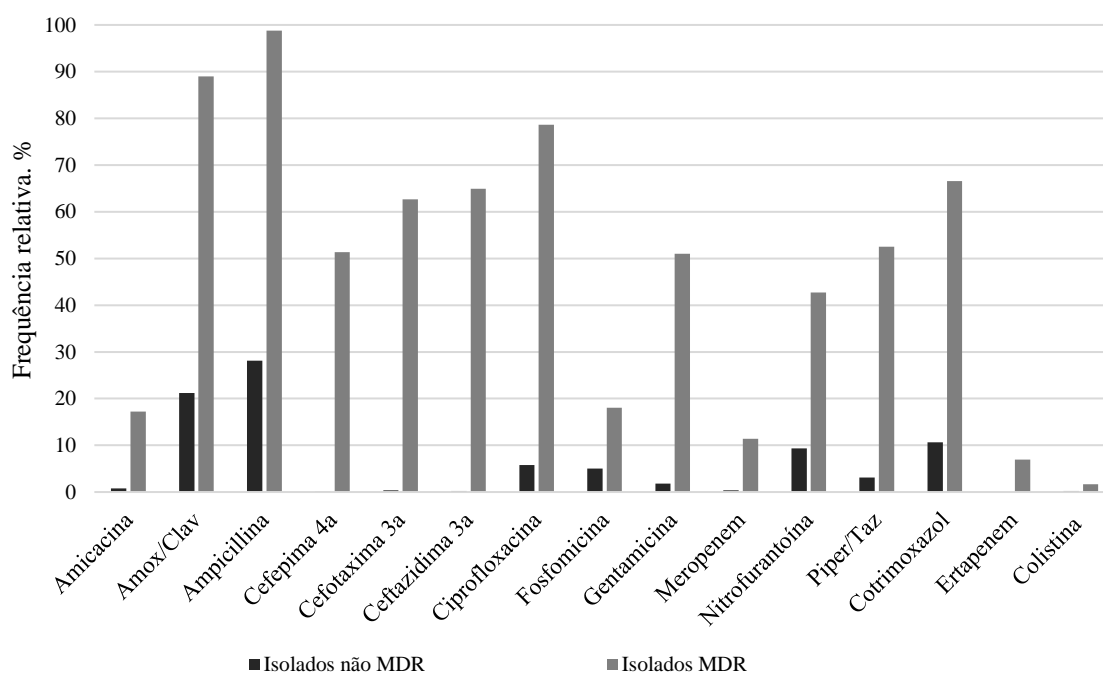


Figura 17. Perfil da resistência aos antibacterianos nos isolados MDR e nos isolados não MDR

Neste estudo observou-se o seguinte perfil de resistência aos antimicrobianos, nas estirpes MDR (Figura 17): 89.0% foram resistentes à Amox/Clav, 98.8 % à ampicilina, 78.6 à ciprofloxacina, 66.6 % ao cotrimoxazol, 64.9 à ceftazidima, 62.7 % à cefotaxima, 52.5 % à Pip/Taz, 51.4 % à cefepima, 51.0 % à gentamicina, 42.7 % à nitrofurantoína, 18.1 % à fosfomicina, 17.2 % à amicacina, 11.4 % ao meropenem, 7.0 % ao ertapenem, 1.7 % à colistina. O perfil da resistência aos ANB referente a cada espécie pode ser consultado nos Anexos III e IV.

Como é possível verificar, foi detectada uma elevada discrepância na resistência aos antibacterianos entre as estirpes multirresistentes e não multirresistentes. Taxas elevadas de resistência aos ANB estabelecidos para tratamento empírico atual de infeções urinárias (Amox/Clav, nitrofurantoína, fosfomicina, amicacina, gentamicina e cefalosporinas da segunda e da terceira geração) podem levar a elevada taxa de falência terapêutica face às ITU causadas por estirpes MDR ((NP n° 015/2011). O ANB mais crítico é Amox/Clav com taxa de resistência de 21.2 % e 89.0 % nos isolados não MDR e MDR, respetivamente.

5.1 Resistência às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos

Ultimamente o uso de fluoroquinolonas no tratamento de ITU diminuiu devido à restrição do seu uso pela DGS. De fato, em Portugal observa-se uma taxa elevada de resistência de *E coli* às fluoroquinolonas (cerca de 33% segundo de dados de PPCIRA (Paiva et al., 2014) e ao cotrimoxazol, que tinham sido abusivamente utilizados durante várias décadas para o tratamento de ITU.

No presente estudo, também se registaram taxas elevadas de resistência às fluoroquinolonas e cotrimoxazol. A resistência às fluoroquinolonas foi de 25.2 % quando considerados todos os isolados e 78.6 % considerando apenas as estirpes MDR. A taxa de resistência ao cotrimoxazol constituiu 25.1 % considerando a totalidade dos isolados e 66.6 % nas estirpes MDR. Portanto, a restrição de uso de fluoroquinolonas no tratamento de ITU em Portugal continua relevante (Norma ITU 2011).

Observaram-se também elevadas taxas de resistência aos aminoglicosídeos, utilizados para o tratamento de ITU superiores, nomeadamente 14.7 % e 5.1 % para a gentamicina e a amicacina, respectivamente, considerando a totalidade dos isolados, e 51.0 % e 17.2 % considerando apenas as estirpes MDR. No entanto, segundo os resultados de TSA, a sensibilidade à amicacina é maior em comparação com à gentamicina em isolados analisados sendo que a primeira pode ser utilizada com maior segurança para o tratamento de ITU.

5.2 Resistência aos beta-lactâmicos.

Segundo dos resultados do presente estudo 38.1 % e 41.2 % de estirpes isoladas foram resistentes à Amox/Clav e à ampicilina, respetivamente. Nas estirpes MDR essa resistência constituiu 89.0 % para Amox/Clav e 99,0 % para ampicilina. A resistência às penicilinas e aminopenicilinas deve-se à produção de beta-lactamases de tipo TEM-1 e SHV-1 codificadas em plasmídeos. No presente estudo, observaram-se elevadas taxas de resistência às cefalosporinas nas bactérias MDR causadoras de ITU (Figura 17). Estudos mostram que a substituição de alguns aminoácidos nas TEM-1 e SHV-1 levou ao aparecimento de ESBL com a resistência às cefalosporinas de terceira, quarta geração e monobactams (Quinn et

al., 1989; Chong et al., 2010; Ben Achour et al., 2014) e que a maioria de ESBL podem ser inibidas por ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam e avibactam (Rodríguez-Baño et al., 2012; Tamma et al., 2017). A resistência aos fármacos que combinam as penicilinas e inibidores de beta-lactamases pode ser mediada por betalactamases de tipo OXA-1, hiperprodução de penicilinases, AmpC plasmídicas, hiperprodução de AmpC cromossômicas, ou à produção de beta-lactamases resistentes aos inibidores de tipo TEM(IRT) (ECDC, 2017). Segundo os resultados do presente estudo somente 6.6 % e 33.8 % de bactérias produtoras de ESBL apresentaram sensibilidade a Amox/Clav e a Pip/Taz, respetivamente. No entanto, verificou-se uma resistência à Pip/Taz mais elevada em estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (83.8 %) em comparação com *E. coli* (35.5 %) produtoras de ESBL. De fato, na última década observou-se a larga disseminação de ESBL de tipo CTX-M resistentes aos inibidores de betalactamases nos vários países inclusive Portugal (Canton et al., 2012; Zhang et al., 2014; Rodrigues et al., 2015). Outra família crescente de tipo OXA-, que inclui as carbapenemases de tipo OXA-48, leva à resistência à oxacilina e cloxacilina, sendo pouco afectada pelo ácido clavulânico (Guo et al., 2016). Quando se verifica a expressão de OXA-48 observa-se uma redução da suscetibilidade aos carbapenemos. No entanto, a mesma estirpe pode adquirir várias beta-lactamases o que leva a resistência mais ampla aos beta-lactâmicos.

Embora se recomende o uso de carbapenemos em todas as infeções causadas por microrganismos ESBL positivos (Vardakas et al., 2012; Tamma et al., 2017) alguns autores propõem não utilizar essa estratégia nas doenças não severas, tal como UTI, para diminuir o seu uso excessivo (Tamma et al., 2017; D'Angelo et al., 2016). De fato, os outros beta-lactâmicos, tal como cefamicinas, cefepima, piperacilina/tazobactam, ceftolazane/tazobactam e ceftazidima/tazobactam, podem ser utilizados eficazmente nestes casos devido a baixa carga de bactérias ou “efeito de *inoculum*” de baixo grau. No entanto, no Reino Unido, por exemplo, não se recomenda o uso de β -lactâmicos em tratamentos empíricos de ITU devido a alta prevalência das estirpes produtoras de ESBL de tipo CTX-M (Woodford et al., 2004) e o trimetoprim é prescrito em cerca de 50% de casos, de seguida a furantoina – 25% enquanto as cefalosporinas e as penicilinas são prescritos em cerca de 7% e 10% dos casos, respetivamente (Ahmed et al., 2018).

Da totalidade de isolados no nosso estudo foram registadas 36 estirpes Gram-negativas resistentes aos carbapenemos em pacientes com idade > 56 anos. No tratamento de ITU causadas por bactérias resistentes aos carbapenemos são utilizadas a colistina ou a tigeciclina de forma empírica sendo a antibioticoterapia ajustada, se necessário, com base nos

resultados de TSA. De fato, nalguns casos os antibacterianos mais simples, tal como fosfomicina (Patwardhan & Singh, 2017), nitrofurantoína em ITU inferiores ou amicacina em ITU superiores podem ser eficazes. Contudo, o aparecimento de estirpes resistentes à colistina é já uma realidade (Liu et al., 2016). No presente estudo foram isoladas cinco estirpes resistentes a colistina; três de *K. pneumoniae*, uma de *E. coli* e uma de *Citrobacter koseri*.

5.3 Resistência combinada

Frequentemente as estirpes produtoras de ESBL possuem, também, a resistência às fluoroquinolonas (Paterson et al., 2000). Segundo de dados de EARS-Net de 2015 em Portugal no ano 2012-2015, cerca de 25% dos isolados invasivos de *K. pneumoniae* apresentavam a resistência combinada às cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (ECDC, 2017). No presente estudo foi registada uma elevada taxa de resistência combinada às fluoroquinolonas (85.5 %) e aminoglicosídeos (56.5 % à gentamicina e 33.9 % à amicacina) em *E. coli* produtoras de ESBL. O mesmo se observou em isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, dos quais 85.13 % e 62.16 % foram resistentes à ciprofloxacina e gentamicina, respetivamente. A taxa de resistência à amicacina constituiu 10.8 % e à piperacilina/tazobactam 83.8 % em *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. De acordo com vários estudos, as ESBL de tipo CTX-M frequentemente são associadas aos genes de resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas o que leva à sua emergência e disseminação rápida devido a pressão seletiva por estas três classes de ANB (Morosini et al., 2006). Um alto nível de resistência combinada às fluoroquinolonas associado as bactérias produtoras ESBL, foi também registado nos países asiáticos (Jean et al., 2016). As bactérias deste fenótipo são resistentes a todos os beta-lactâmicos exceto de imipenem e ertapenem, no entanto, como elas apresentaram taxa elevada de suscetibilidade à amicacina (*K. pneumoniae*) e piperacilina/tazobactam (*E. coli*), esses fármacos foram recomendados como alternativa no tratamento de ITU.

Da totalidade de bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenemos isoladas nesse estudo 15 pertencem à família *Enterobacteriaceae* e 21 à *Pseudomonaceae*. Da família *Pseudomonaceae*, 52.4 % eram resistentes à amicacina, 66.7 % à gentamicina e 85.7 % à ciprofloxacina. Da família *Enterobacteriaceae* 20.0 % tinham sido intermédios à amicacina, 33.3 % resistentes à gentamicina, 73.3 % à ciprofloxacina e duas estirpes à colistina. Duas estirpes de *K. pneumoniae* produziam ESBL e carbapenemases simultaneamente. Estes dados são preocupantes e confirmam a presença de estirpes com a resistência combinada. Vários estudos mostram que algumas carbapenemases de tipo NDM-1 estão disseminadas

em vários clones e espécies de *Enterobacteriaceae*, e alojados em plasmídeos que podem carregar outros tipos de carbapenemases de tipo OXA-48 e VIM ou ESBL, e ainda os genes de resistência aos aminoglicosídeos (metilases de 16S RNA), macrólidos, rifampicina, sulfametoxazol (Nordmann et al., 2011; Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). A resistência aos carbapenemos na família *Pseudomonaceae* deve-se à combinação da produção AmpC, sobre-expressão de bombas de efluxo e alterações em Pbp (Buehrle et al., 2017).

6. Prevenção e controlo de RA em Portugal

Segundo do relatório de PPCIRA de 2013 “Portugal é o país europeu com mais elevada taxa de MRSA e está entre os países com taxa mais elevada de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, de *E. coli* resistente às quinolonas e de *Acinetobacter* com resistência extensiva e apenas suscetível à colistina; a taxa de *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenemos é ainda baixa, mas preocupantemente crescente a taxa de IACS e de uso de ANB em hospitais portugueses. O consumo hospitalar de antimicrobianos em Portugal parece ser superior à média europeia... e apresenta evidentes distorções, nomeadamente excessivo, embora decrescente, consumo de quinolonas na comunidade, elevado consumo hospitalar de carbapenemos, excessiva duração da profilaxia antibiótica cirúrgica e, provavelmente, excessiva prescrição e duração de terapêutica antimicrobiana... A taxa de infeção hospitalar em Portugal é claramente mais elevada do que a média europeia e parece ter tendência crescente...” (Paiva et al., 2013) Os dados da ocorrência e disseminação de RA nos todos 28 países de EU, incluindo a Islândia e Noruega, são coletados por um sistema de vigilância *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) Os dados de resistência aos antibacterianos em Portugal referente ao intervalo de 2013-2016 disponibilizados pelo EARS-Net estão apresentados no Anexo V. Devido ao crescimento contínuo de RA no relatório do PPCIRA de 2014, propunha-se o cumprimento de objetivos principais seguintes: “(1) reduzir a duração média de terapêutica antibiótica; (2) reduzir até anular % de doentes com profilaxia antibiótica cirúrgica > 24h; (3) aumentar dias livres de antibiótico; (4) reduzir % de doentes com feridas crónicas a realizar terapêutica antibiótica sistémica; (5) reduzir consumo de quinolonas na comunidade e de carbapenemos no hospital (DHD) e (6) reduzir % de doentes internados que adquirem colonização ou infeção por MDR; ... Todas as Unidades de Saúde devem colocar ênfase significativa na contínua redução da taxa de resistência à metilina do *S. aureus* e na contenção da emergência de resistência a carbapenemos nas *Enterobacteriaceae*” (Paiva et al., 2014).

Ainda foram implementadas várias normas de controlo e prevenção de colonização e a infeção, tal como as diretivas da DGS de Portugal que incentivam o rastreio dos utentes portadores de MRSA e carbapenemases a ser internados de modo a proceder ao isolamento adequado destes doentes, a comunicação e recolha obrigatória de microrganismos “Alerta” para identificação de mecanismos de RA, registo de microrganismos “Problema” etc. (NP n° 018/2014; NP n° 004/2013; PPCIRA, 2017).

Para recolha de dados da disseminação de RA em Portugal foi instituída uma Rede Nacional de Vigilância Epidemiológica de Resistência aos Antimicrobianos que, em 2013, abrangeu 120 laboratórios de microbiologia (Paiva, 2014). Assim, segundo a Norma da DGS nº 004/2013 de 08/08/2013, atualizada a 13/11/2015, os laboratórios devem comunicar num prazo máximo de 48 horas os microrganismos “alerta” seguintes: *S. aureus* com resistência à vancomicina, ao linezolid; à daptomicina; *E. faecium* e *E. faecalis* com resistência ao linezolid; *Enterobacteriaceae* com resistência aos carbapenemos; *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* com resistência à colistina. Os microrganismos “alerta” isolados ainda devem ser conservados e enviados ao INSA para validar o padrão de resistência e estudar o mecanismo da RA. Ainda se pede a comunicação com uma periodicidade de três meses de microrganismos “problema” de origem invasiva isolados de sangue e LCR independentemente do seu perfil da suscetibilidade aos ANB nomeadamente: *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Streptococcus pneumoniae* e *Clostridium difficile* isolado de outras fontes.

Existem, também, vários estudos de vigilância epidemiológica longitudinais internacionais que têm como alvo a identificação e investigação de mecanismos de resistência nos isolados específicos provenientes de laboratórios aderentes de vários países, inclusive o CHBV: SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*) e T.E.S.T. (*Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*) (Fluit et al., 2000; Sader et al., 2014; Jean et al., 2016; Rodloff & Dowzicky, 2018). Por exemplo, T.E.S.T. tem como alvo a monitorização da atividade *in vitro* de um ANB de largo espetro, a tigeciclina, e fornece os dados sobre as alterações na suscetibilidade nos patógenos clínicos importantes.

Para além de controlo epidemiológico é importante a investigação na área de modo a encontrar outras soluções para o combate e o controlo do crescimento de RA. Assim, o desenvolvimento de novos antibióticos é de alta importância a nível mundial (WHO, 2017). Novos compostos antibacterianos podem ser descobertos no meio ambiental (solo) ou desenvolvidos através da exploração de ANB conhecidos, tal como os lantibióticos (Birbaum & Sahl, 2009; Wohlleben et al., 2016). A produção de ANB sintéticos e semissintéticos é uma área promissora devido a possibilidade de síntese direcionada de novos antimicrobianos ou a modificação química de compostos naturais já existentes (Patrick, 2005; Wright et al., 2014). É importante a procura de novos alvos para ação antimicrobiana, tal como inibidores de bombas de efluxo (Pagés et al., 2010). Uma abordagem importante no combate RA é continuação e aumento de investigação e

desenvolvimento na área de imunoterapia e imunoprofilaxia, tal como o desenvolvimento de novas vacinas, terapias a base de anticorpos ou citocinas. (Speelberg et al., 2008). Uma outra alternativa é a terapia fágica que tem vantagem de ser altamente específica e facilmente atualizável face às resistências (Wright et al., 2009; Lin et al., 2010).

Conclusão

As ITU constituem uma elevada parte de IACS que frequentemente têm como causa as estirpes multirresistentes e que têm cada vez menos opções para o tratamento. Os fármacos disponíveis para estes tratamentos são escassos e têm efeitos secundários nefastos. Os pacientes com idades avançadas, com várias comorbidades e sistema imunitário comprometido têm maior risco de contrair essas infeções que podem levar as complicações graves, ao prolongamento do tempo de internação ou à morte. Embora em Portugal se observem avanços no controlo da prescrição de ANB e rastreio de estirpes resistentes no sector de saúde isso não acontece na produção pecuária e agrícola. Esse excesso de uso de ANB pode levar à seleção de estirpes multirresistentes e a sua disseminação na comunidade através de produtos alimentícios. De facto, torna-se normal utilizar vários cursos de ANB para tratar uma infeção adquirida na comunidade. Apesar de existir uma extrema necessidade de novos fármacos antibacterianos, o seu desenvolvimento é um desafio com muitos obstáculos, um processo longo burocrático e pouco rentável. O aumento de resistência aos antibióticos é uma ameaça global e só pode ser resolvida através da colaboração intergovernamental de vários países. Se não houver soluções para este problema num futuro próximo, muitos tratamentos inovadores tornar-se-ão impraticáveis. De facto, as cirurgias, tratamentos invasivos e imunossuppressores, poderão levar a infeções incuráveis.

Referencias

- Ahmed H, Farewell D, Jones HM, Francis NA, Paranjothy S, Butler CC. 2018. Incidence and antibiotic prescribing for clinically diagnosed urinary tract infection in older adults in UK primary care, 2004-2014. *PLoS ONE* 13(1):e0190521.
- Alexander BT, Marschall J, Tibbetts RJ, Neuner EA, Dunne WM Jr, Ritchie DJ. 2012. Treatment and clinical outcomes of urinary tract infections caused by KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a retrospective cohort. *Clin Ther* 34(6):1314-1323.
- Allison C, Coleman N, Jones PL, Hughes C. 1992. Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect Immun* 60(11):4740-4746.
- Arinzon ZI, Shabat S, Peisakh A, Berner Y. 2011. Clinical presentation of urinary tract infection (UTI) differs with aging in women. *Arch Gerontol Geriatr*. 2012 Jul-Aug;55(1):145-7.
- Aydeniz Ozansoy F, Cevahir N, Kaleli İ. 2015. *Staphylococcus aureus* Investigation of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance in strains isolated from clinical samples by phenotypical and genotypical methods. *Mikrobiyol Bul* 49(1):1-14.
- Bader MS, Loeb M, Brooks ANB. 2016. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance, *Postgraduate Medicine* 1-17.
- Bail L, Ito A, Esmerino L. 2006. Infecção do trato urinário: Comparação entre o Perfil de Susceptibilidade e a Terapia Empírica com Antimicrobianos. *Rev Bras Anal Clin* 38:51-56.
- Bailey & Scott's. 2014. Infections of the urinary tract. In: *Diagnostic microbiology*. Elsevier Inc 14th edition pp.: 919-930 ISBN: 978-0-323-08330-0
- Ballhausen B, Kriegeskorte A, Schleimer N, Peters P, Becker K. 2014. The mecA Homolog mecC Confers Resistance against β -Lactams in *Staphylococcus aureus* Irrespective of the Genetic Strain Background. *Antimicrob Agents and Chemother* 58(7):3791-3798.
- Barroso H, Melo-Silvestre A, Taveira N. 2013. *Microbiologia médica*. V 2: Fundamentos de microbiologia. Editora: Lidel. 544 pp.: 343-357. ISBN: 978-9897520570.
- Bauer G, Berens C, Projan SJ, Hillen W. 2004. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. *J Antimicrob Chemother* 53(4):592-9.
- Belas R, Schneider R, Melch M. 1998. Characterization of *Proteus mirabilis* Precocious Swarming Mutants: Identification of *rsbA*, Encoding a Regulator of Swarming Behavior. *J Bacteriol* 180(23): 6126-6139.
- Ben Achour N, Belhadj O, Galleni M, Ben Moussa M, Mercuri PS. 2014. Study of a Natural Mutant SHV-Type β -Lactamase, SHV-104, from *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Microbiol* 2014():548656.
- Bierbaum G & Sahl HG. 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009 Jan;10(1):2-18.
- Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LC, Potoski BA, Clancy CJ, Nguyen MH. 2017. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Microbiologic Treatment Failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jan; 61(1): e01243-16.
- Burall LS, Harro JM, Li X, Lockett CV, Himpel SD, Hebel JR, Johnson DE, Mobley HLT. 2004. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infection and Immunity*. 72(5): 2922-2938.
- Burke JP, Riley DK. Nosocomial urinary tract infection. In: Mayhall CG, editor. *Hospital epidemiology and infection control*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996. p. 139-53.
- Bush K & Jacoby GA. 2010. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3): 969-976.
- Caetano T, Ferreira S, Mondego AP, Correia A, Mendo S. 2006. In99, an In100-related integron, its occurrence and prevalence in clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains from a central region of Portugal. *Epidemiol Infect* 135, 03: 502 - 502.
- Canas-Ferreira W, Sousa JC, Lima N. 2010. *Microbiologia*. Editor: Lidel. 640p.:p.49. ISBN: 978-9727575152
- Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. 2016. MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 1-6.
- Canton R, González-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion, *Front Microbiol*. 2012; 3: 110.
- Carey S, Copeland MF, Sacotte R, Tuson HH, Weibel DB. 2013. Flagellum density regulates *Proteus mirabilis* swarmer cell motility in viscous environments. *J Bacteriol* 195(2):368-377.

- CDC, 2002. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Staphylococcus aureus resistant to vancomycin—United States. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51:565-567.
- Chiu SK, Chan MC, Huang LY, Lin YT, Lin JC, Lu PL, Siu LK, Chang FY, Yeh KM. 2017. Tigecycline resistance among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Clinical characteristics and expression levels of efflux pump genes. PLoS One 12(4): e0175140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175140>.
- Chong Y, Yakushiji H, Ito Y, Kamimura T. 2010. Cefepime-resistant Gram-negative bacteremia in febrile neutropenic patients with hematological malignancies. International J Infect Dis 14(3):e171-e175.
- Christian NA, Roye-Green K, Smikle M. 2010. Molecular epidemiology of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at a Jamaican hospital, 2000 - 2004 BMC Microbiol 10: 27.
- Cole KA, Rachel M. Kenneyb, Mary Beth Perric, Lisa E. Dumkowd, Linoj P. Samuele, Marcus J. Zervosc,f,g and Susan L. Davis. 2015. Outcomes of Aminopenicillin Therapy for Vancomycin-Resistant Enterococcal Urinary Tract Infections. Antimicrob. Agents Chemother 59 (12): 7362-7366.
- Colombo AL, Guimarães T. 2007. Candiduria: a clinical and therapeutic approach. Rev Soc Bras Med Trop. 2007 May-Jun;40(3):332-7.
- Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G. Paperback. 2012. European Manual of Clinical Microbiology. 469 pp. ISBN-10: 2-87805-026-6
- Cornaglia G, Hryniewicz W, Jarlier V, Kahlmeter G, Mittermayer H, Stratchounski L, Baquero F. 2004. European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 349–383.
- Crider KS, Cleves MA, Reefhuis J, Berry RJ, Hobbs CA, Hu DJ. Nov 2009. Antibacterial medication use during pregnancy and risk of birth defects: National Birth Defects Prevention Study. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine 163 (11): 978–985.
- D'Angelo RG, Johnson JK, Bork JT, Heil EL. 2016. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. Expert Opin Pharmacother 17(7):953-67.
- de Almeida, João Ferreira, Bíblia Sagrada em português. Sociedade Bíblica de Portugal SBP-EPS-2008-21,05K-DN6, ISBN:978-972-8780.99-9 DN63.
- de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, Nagler J, Icket C, Kalenic S, Horvatic J, Seifert H, KANBSch AJ, Paniara O, Argyropoulou A, Bompola M, Smyth E, Skally M, Raglio A, Dumpis U, Kelmere AM, Borg M, Xuereb D, Ghita MC, Noble M, Kolman J, Grabljevec S, Turner D, Lansbury L, Grundmann H; BURDEN Study Group. 2011. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother 55(4):1598-1605.
- Delcour AH. 2008. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. Biochim Biophys Acta 1794(5): 808–816.
- Djordjevic Z, Folic MM, Zivic Z, Markovic V, Jankovic SM. 2013. Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species: sensitivity to antibiotics and risk factors. Am J Infect Control 41(12):1182-7.
- Du X, He F, Shi Q, Zhao F, Xu J, Fu Y and Yu Y. 2018. The Rapid Emergence of Tigecycline Resistance in blaKPC-2 Harboring *Klebsiella pneumoniae*, as Mediated in Vivo by Mutation in tetA During Tigecycline Treatment. Front Microbiol 9: 648.
- Duin D & Paterson D. 2016. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. Infect Dis Clin North Am. 2016 Jun; 30(2): 377–390.
- ECDC. 2017. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017. ISBN: 978-92-9498-029-8
- Esposito AL, Gleckman RA, Cram S, Crowley M, McCabe F, Drapkin MS. 1980. Community-acquired bacteremia in the elderly: analysis of one hundred consecutive episodes. J Am Geriatr Soc 28:315-319.
- EUCAST. 2016. /www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
- EUCAST. 2016. Intrinsic Resistance and Exceptional Phenotypes Tables. Expert Rules, Version 3.1 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rules_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf
- EUCAST. 2018. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, 2018. <http://www.eucast.org>

- Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. 2014. Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Systematic Evaluation of the Available Evidence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(2):654–663.
- Fernández L, Hancock REW. 2012. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* 25(4): 661–681.
- Fisher JF, Chew WH, Shadomy S, Duma RJ, Mayhall CG, House WC. 1982. Urinary tract infections due to *Candida albicans*. *Rev Infect Dis*. 1982 Nov-Dec;4(6):1107-18.
- Fisher JF, Sobel JD, Kauffman CA, Newman CA. 2011. Candida urinary tract infections--treatment. *Clin Infect Dis*. 2011 May; 52 Suppl 6:457-466.
- Fisher K & Philips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol* 155: 1749–1757.
- Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. 2000. Antimicrobial resistance among urinary tract infection (UTI) isolates in Europe: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997.
- Fournier PE, Richet H. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 42:692.
- Foxman B. 2014. Urinary tract infection syndromes. Occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin of North America* 28(1):1–13.
- Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. 2007. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in *Enterobacteriaceae*, Central African Republic (CAR). *J Antimicrob Chemother* 59:742-745.
- Fraser GM, Claret L, Furness R, Gupta S, Hughes C. 2002. Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* hpmBA haemolysin operon. *Microbiology* 148(7):2191-2201.
- Garneau-Tsodikova S & Labby KJ. 2016. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Med Chem Comm* 7(1): 11–27.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187(7):2426-2438.
- Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Gupczynski Y, Nordmann P et al., 2017. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0 From July 2017 based on version 1.0 from December 2013 by the EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.
- Gonçalves IR, Dantas RCC, Ferreira ML, da Fonseca Batistão DW, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. 2017. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Braz J Microbiol* 48(2): 211–217.
- Griebing TL. 2005. Urologic diseases in America project: trends in resource use for urinary tract infections in women. *J Urol* 173(4):1281–1287.
- Guo L, An J, Ma Y, Ye L, Luo Y, Tao C, Yang J. 2016. Nosocomial Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383. *PLoS One* 11(8):e0160754.
- Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, Moran GJ, Nicolle LE, Raz R, Schaeffer AJ, Soper DE. 2011. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 52 (5): e103–e120. doi:10.1093/cid/ciq257.
- Heintz BH, Halilovic J, Christensen CL. 2010. Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. *Pharmacother* 30(11):1136-49.
- Hickerson AD, Carson CC. 2006. The treatment of urinary tract infections and use of ciprofloxacin extended release. *Expert Opin Investig Drugs* 15(5):519-32.
- Hoban DJ, Lascols C, Nicolle LE. 2012. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, including molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing species, in urinary tract isolates from hospitalized patients in North America and Europe: results from the SMART study 2009–2010. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74:62–67.
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Inter J Antimicrob Agent* 35:322-332.

- Hughes D & Andersson DI. 2012. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentration.
- Jean SS, Coombs G, Ling T, Balaji V, Rodrigues C, Mikamo H, Kim MJ, Rajasekaram DG, Mendoza M, Tan TY, Kiratisin P, Ni Y, Weinman B, Xu Y, Hsueh PR. 2016. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends. *Int J Antimicrob Agents* 47(4):328-334.
- Jensen P, Briaies A, Brochmann RP, Wang H, Kragh KN, Kolpen M, Hempel C, Bjarnsholt T, Høiby N, Ciofu O. 2014. Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathog Diseases* 70(3): 440–443
- Jhora ST & Paul S. 2011. Urinary Tract Infections Caused by *Staphylococcus saprophyticus* and their antimicrobial sensitivity pattern in Young Adult Women Bangladesh *J Med Microbiol* 05 (01): 21-25
- Jones BD & Mobley HL. 1988. *Proteus mirabilis* urease: genetic organization, regulation, and expression of structural genes. *J Bacteriol* 170(8):3342-3349.
- Jones RN, Ballow CH, Biedenbach DJ, Deinhard JA, Schentag JJ. 1998. Antimicrobial activity of quinupristin-dalfopristin (RP 59500, synercid) tested against over 28,000 recent clinical isolates from 200 medical centers in the United States and Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 31:437-451.
- Jorgensen KM, Wassermann T, Jensen PO, Hengzuang W, Molin S, Hoiby N, Ciofu O. 2013. Sublethal Ciprofloxacin Treatment Leads to Rapid Development of High-Level Ciprofloxacin Resistance during Long-Term Experimental Evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (9): 4215-4221.
- Kamat US, Fereirra A, Amonkar D, Motghare DD, Kulkarni MS. 2009. Epidemiology of hospital acquired urinary tract infections in a medical college hospital in Goa. *Indian J Urol* 25(1): 76–80.
- Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Vincent JL. 2016. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care* 20: 136.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K- 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jun; 44(6):1549-1555.
- Katzung BG & Trevor AJ. 2017. *Farmacologia Básica e Clínica*. Edição: 13ª. Editor: Artmed. ISBN: 978-85-8055-597-4. Pp. 866
- Keating GM. 2013. Fosfomycin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs* 73(17):1951-1966. doi: 10.1007/s40265-013-0143-y.
- Kobayashi M, Shapiro DJ, Hersh AL, Sanchez GV, Hicks LA. 2016. Outpatient antibiotic prescribing practices for uncomplicated urinary tract infection in women in the United States, 2002–2011. *Open Forum Infect Dis* 3(3):159.
- Kumar S & Varela MF. 2013. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Publisher: Formatex Research Center, pp.522-534.
- Lambert ML, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, Agodi A, Frank U, Mertens K, Schumacher M, Wolkewitz M. 2011. Clinical outcomes of healthcare-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis* 11:30–38.
- Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P et al., 2011. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Expert Rules version 2.0 From 29 September 2011. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 141–160 atualizado em EUCAST intrinsic resistance and exceptional phenotypes, Expert Rules version 3.1 From 26 September 2016
- Lee SS, Kim Y, Chung DR. 2011. Impact of discordant empirical therapy on outcome of community-acquired bacteremic acute pyelonephritis. *J Infect* 62(2):159-64.
- Li G, Quan F, Qu T, Lu J, Chen Sh, Cui L, Guo D, Wang Y. 2015. Sublethal vancomycin-induced ROS mediating antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biosci Rep* 35(6): e00279.
- Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ. 2010. Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 161(4):308–314.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16(2):161-8.
- Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP. 2006. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2941.

- Magalhães S, Brandão C, Soares S, Ramalheira E, Ferreira S. 2014. Surveillance of *Acinetobacter baumannii* isolates resistant to carbapenems during a 10-year period (2003-2012) in Aveiro, Portugal. European Congress of Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona.
- Magalhães SV. 2014. Epidemiologia de isolados multirresistentes na comunidade. Departamento de Química. Universidade de Aveiro.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268–281.
- Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. 2017. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37(4):587-604.
- Maki DG and Tambyah PA. 2001. Engineering Out the Risk for Infection with Urinary Catheters. *Emerging Infect Dis* 7(2): 342-347.
- Marschall J1, Zhang L, Foxman B, Warren DK, Henderson JP; CDC Prevention Epicenters Program. 2012. Both host and pathogen factors predispose to *Escherichia coli* urinary-source bacteremia in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 54(12):1692-8.
- Mehnert-Kay SA. 2005. Diagnosis and Management of Uncomplicated Urinary Tract Infections. *Am Fam Physician* 72(3):451-456.
- Meyer EI, Gastmeier P, Deja M, Schwab F. 2013. Antibiotic consumption and resistance: data from Europe and Germany. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6-7):388-95. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.04.004. Epub 2013 Apr 29. 85% of all antibiotics used in Germany are administered in animals; 85% of the antibiotics used in humans are prescribed in the outpatient setting and 85% of the antibiotics used in hospitals are prescribed on non-ICUs wards.
- Miotla P, Romanek-Piva K, Bogusiewicz M, Markut-Miotla E, Adamiak A, Wróbel A, Zebrowska M, Wawrysiuk S, Katarzyna Mendyk K, Rechberger E, Jakubczak A, Rechberger T. 2017. Antimicrobial Resistance Patterns in Women with Positive Urine Culture: Does Menopausal Status Make a Significant Difference? *BioMed Research International* 1: 1-6.
- Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. 2009. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. 2(3): 101-111.
- Mobley HL, Donnenberg MS, Hagan EC. 2009. Uropathogenic *Escherichia coli*. *Eco Sal Plus* Aug 3(2): 34-40.
- Mody L & Juthani-Mehta M. 2014. Urinary tract infections in older women: a clinical review. *The Journal of the American Medical Association*, vol.311,no.8,pp.844–854,2014.
- Morosini MI, García-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, Baqueiro F, Canton R. 2006. Antibiotic Coresistance in Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and In Vitro Activity of Tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Aug; 50(8): 2695–2699.
- Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, Retailleau P, Iorga BI. 2017. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzym Inhibition and Medicin Chem* 32(1): 917-919.
- Naylor NR, Atun R, Zhu N, Kulasabanathan K, Silva S, Chatterjee A, Knight GM, Robotham JV. 2018. Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrob Resist Infect Control* 25(7):58. doi: 10.1186/s13756-018-0336-y. eCollection 2018.
- Nguyen Y, Sperandio V. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2:90.
- Nicolle LE. 2014. Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 3:23.
- Nordmann P, NANBs T, Poirel L. 2011. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 17(10):1791-1798.
- NP nº 015/2011. Terapêutica de infeções do aparelho urinário (comunidade). Norma da Direção-Geral da Saúde número nº 015/2011, de 30/08/2011.
- NP nº 029/2012. Precauções Básicas do Controlo da Infecção (PBCI). Norma da Direção-Geral da Saúde número 029/2012, de 29 de dezembro, atualizada a 31/10/2013.
- O'Neill J. 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Antimicrob Resist Rev* 12: 1-20.
- Oberoi L & Aggarwal A. 2010. Multidrug resistant Enterococci in a rural tertiary care hospital - a cause of concern. *JK Science* 12(3):157-158.
- O'Brien K, Edwards A, Hood K, Butler CC. 2013. Prevalence of urinary tract infection in acutely unwell children in general practice: a prospective study with systematic urine sampling. *Br J Gen Pract* 63(607): e156-64.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (May 2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation". *Nature*. 405 (6784): 299–304.

- O'Neill J. 2015. Securing new drugs for future generations: The pipeline of antibiotics. *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* 5: 1-41.
- Pagès JM, Sandrine AF, Mahamoud A, Bolla JM, Davin-Regli A, Chevalier J, Garnotel E. 2010. Efflux pumps of gram-negative bacteria, a new target for new molecules. *Curr Top Med Chem* 10(18):1848-57.
- Pailhoriès H, Cassisa V, Chenouard R, Kempf M, Eveillard M, Lemarié C. 2017. *Staphylococcus saprophyticus*: Which beta-lactam? *Int J Inf Dis* 65: 63-66.
- Paiva J, Pina E, Silva MG. 2013. Portugal: Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números – 2013. Lisboa: Direção-Geral da Saúde. ISSN: 2183-072X
- Paiva J, Pina E, Silva MG. 2014. Portugal: Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números – 2014. Lisboa: Direção-Geral da Saúde. ISSN: 2183072X
- Park KS, Kim MH, Park TS, Nam YS, Lee HJ, Suh JT. 2012. Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, AAC(6)-Ib-cr, qepA, and oqxAB in clinical isolates of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Ann Clin Lab Sci*. Spring; 42(2):191-197.
- Park SH, Ithon K, Fujisawa T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *J Appl Microbiol* 95:294–300.
- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. 2000. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia, *Clin Infect Dis* 30:473-478.
- Patrick GL. 2005. Antibacterial agents. In: *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford University Press 3rd edition. New York pp. 414-466. ISBN: 0199275009.
- Patwardhan V & Singh S. 2017. Fosfomycin for the treatment of drug-resistant urinary tract infections: potential of an old drug not explored fully. *Int Urol Nephrol* 49(9):1637-1643.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21(3):538-82.
- Poole K. 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 61(17):2200-2223.
- Poole K. 2011. *Pseudomonas Aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front Microbiol* 2: 65.
- Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjardé SS, Chopade BA. 2011. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62(3):328–338.
- PPCIRA. 2017. Recomendação de PPCIRA, de 22 de maio de 2017. Prevenção da Transmissão de Enterobacteriaceas Resistentes aos Carbapenemos em Hospitais de Cuidados de Agudos.
- Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D, Flamm R, Bush K. 1989. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 33(9):1451-6.
- Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. 2014. fluorquinolon resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolution. *Trend Microbio* 22(8):438-445.
- Rezazadeh M, Baghchesaraei H, Peymani A. 2016. Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (qnr) Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* Collected from Several Hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran. *Osong Public Health Res Perspec* 7(5): 307–312.
- Roberts KB, Charney E, Sweren RJ, Ahonkhai VI, Bergman DA, Coulter MP, Fendrick GM, Lachman BS, Lawless MR, Pantell RH. 1983. Urinary tract infection in infants with unexplained fever: a collaborative study. *J Pediatr* 103(6):864-7.
- Rodloff AC, Dowzicky MJ. 2018. In vitro activity of tigecycline and comparators against a European collection of anaerobes collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2010-2016. *J Anaerobe*. 1:1.
- Rodrigues C, Machado E, Pires J, Ramos H, Novais A, Peixe L. 2015. Increase of widespread A, B1 and D *Escherichia coli* clones producing a high diversity of CTX-M-types in a Portuguese hospital. *Future Microbiol* 10(7):1125-31.
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Retamar P, Picón E, Pascual Á. 2012. β -Lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis* 54(2):167-74.
- Ronald A. 2002. The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. A Symposium: Traditional and Emerging Pathogens in UTI. *Amer J Medic* 113 (1A): 14-19.
- Rowe TA & Juthani-Mehta M. 2013. Urinary tract infection in older adults. *Aging health*. 2013 Oct; 9(5): 10.2217/ah.13.38.
- Rowe TA, Juthani-Mehta M. 2014. Diagnosis and Management of Urinary Tract Infection in Older Adults. *Infect Dis Clin North Am* 28(1): 75–89.

- Roxo I, Magalhaes S, Ramalheira E, Ferreira S. 2015a. Epidemiology of ESBL-producing isolates causing UTI in the elderly (Aveiro, Portugal)
- Roxo I, Magalhães S, Ramalheira E, Ferreira S. 2015b. Surveillance of MDR Gram-negatives ESBL-producers and carbapenem resistant, in 12 years period (2003-2014) in Aveiro, Portugal. European Congress of Microbiology and Infectious Diseases, In Surveillance of MDR Gram-negative, ESBL-producing and carbapenem-resistant organisms over 12-year period (2003-2014) in Aveiro, Portugal, Copenhagen.
- Roxo I. 2015. Epidemiologia de estirpes produtoras de β -lactamases. Secção Autónoma de Ciências da Saúde. Universidade de Aveiro.
- Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, Chan WC, Williams P, O'Gara JP, Massey RC. 20012. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *J Infect Dis* 205(5):798-806.
- Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. 2014. Variation in Potency and Spectrum of Tigecycline Activity against Bacterial Strains from U.S. Medical Centers since Its Approval for Clinical Use (2006 to 2012). *Antimicrob Agent Chemother* 58(4): 2274–2280.
- Safdar N, Maki DG. 2002. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med* 136(11):834-44
- Schito GC, 2003. Why fosfomicin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? *Int J Antimicrob Agents* 22(2):79-83.
- Schlager TA. Urinary tract infections in children younger than 5 years of age: epidemiology, diagnosis, treatment, outcomes and prevention. *Paediatr Drugs*. 2001;3:219– 227. *E.coli* mais prevalente
- Sharma R1, Park TE2, Moy S3. 2016. Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms. *Clin Ther Mar* 38(3):431-44.
- Silva CHP. 2008. Urocultura. *Protocolos de Microbiologia Clínica*. News Lab 88:132-137.
- Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Ronning TG, Radtke A, Hegstad K (2016) A Silenced vanA Gene Cluster on a Transferable. Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2016 Jul 60(7): 4119-4127.
- Skold O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* 32: 261–273.
- Soares S. 2013. Epidemiologia de estirpes produtoras de ESBL em ITU. Departamento de Química. Universidade de Aveiro.
- Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, Zervos M, Vazquez JA, Karchmer AW, Lee J, Thomas C, Panzer H, Dismukes WE. 2000. Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000 Jan;30(1):19-24.
- Spadafino JT, Cohen B, Liu J, Larson E. 2014. Temporal trends and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in adults with catheter-associated urinary tract infections. *Antimicrob Resist Infect Control* 3(1):39.
- Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, Bartlett JG, Edwards J Jr. 2008. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 46(2):155-164. doi:10.1086/524891
- Stark RP, Maki DG Bacteriuria in the catheterized patient. What quantitative level of bacteriuria is relevant? *N Engl J Med*. 1984 Aug 30;311(9):560-4.
- Stefaniuk E, Suchocka U, Bosacka K, Hryniewicz W. 2016. Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis* 35(8):1363–1369.
- Stevens DL. 2003. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections: Increasing virulence and emerging methicillin resistance in the new millennium. *Curr Opin Infect Dis* 16(3):189-91.
- Stock I. 2003. Natural antibiotic susceptibility of *Proteus spp.*, with special reference to *P. mirabilis* and *P. penneri* strains. *J Chemother* 15(1):12-26.
- Sum PE, Lee VJ, RT Testa RT, Hlavka JJ, Ellestad GA, Bloom JD, Gluzman Y, Tally FP. 1994. Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. *J Med Chem* 37 (1): 184–188.
- Tamma PD and Rodriguez-Bano J. 2017. The Use of Noncarbapenem β -Lactams for the Treatment of Extended-Spectrum β -Lactamase Infections. *Clin Infect Dis Apr* 1; 64(7): 972–980.
- Tandogdu Z & Wagenlehner FM. 2016. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 29(1):73-9.

- Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. 2017. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol* 15(8):1566.
- Toner L, Papa N, Aliyu SH, Dev H, Lawrentschuk N, Al-Hayek S. 2016a. Candida growth in urine cultures: a contemporary analysis of species and antifungal susceptibility profiles. *QJM* 109(5):325-9.
- Toner L, Papa N, Aliyu SH, Dev H, Lawrentschuk N, Al-Hayek S. 2016b. Vancomycin resistant enterococci in urine cultures: Antibiotic susceptibility trends over a decade at a tertiary hospital in the United Kingdom. *Investig Clin Urol* 57(2): 129–134.
- Tseng CC, Wu JJ, Liu HL, Sung JM, Huang JJ. 2002. Roles of host and bacterial virulence factors in the development of upper urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. *Am J Kidney Dis*. 2002 Apr; 39(4):744-52.
- Tulara NK. 2018. Nitrofurantoin and Fosfomycin for Extended Spectrum Beta-lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Infect Dis* 10(1): 19–21.
- Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. 2012. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 67: 2793–2803.
- Ventola CL. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *PT* 40(4): 277-283.
- Veve MP, Wagner JL, Kenney RM, Grunwald JL, Davis SL. 2016. Comparison of fosfomycin to ertapenem for outpatient or step-down therapy of extended-spectrum β -lactamase urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* Jul 48(1):56-60.
- Vincent SJ & Viola C. 2006 Deliberations of an Advisory Committee regarding priorities, sources, and methods for collecting animal antimicrobial use data in the United States. *73(2-3):133-151*.
- Wagenlehner FM, Lehn N, Witte W, Naber KG. 2005. In vitro activity of daptomycin versus linezolid and vancomycin against Gram-positive uropathogens and ampicillin against enterococci, causing complicated urinary tract infections, *Chemother* 51: 64-9.
- Walker KE, Moghaddame-Jafari S, Lockatell CV, Johnson D, Belas R. 1999. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol* 32(4):825-836.
- Walsh C. 1999. Deconstructing vancomycin. *Science* 284(5413):442-443.
- Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, Sievert DM. 2016. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1:1–14.
- WHO, 2002. Epidemiology of nosocomial infections. In: Prevention of hospital acquired infections. A practical guide. 2nd ed. WHO, Geneva: p. 5. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16355e/s16355e.pdf>
- WHO. 2015. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. WHO Press, Geneva, Switzerland. ISBN: 978-92-4-150976-3
- WHO. 2017. Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
- Wiederhold NP. 2017. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist.* 2017; 10: 249–259.
- Wohlleben W, Mast Y, Stegmann E, Ziemert N. 2016. Antibiotic drug discovery. *Microb Biotechnol.* 2016 Sep; 9(5): 541–548.
- Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. 2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 54(4):735-43.
- Wright A, Hawkins CH, Anggard EE, Harper DR. 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol* 34(4): 349–57.
- Wright PM, Seiple IB, Myers AG. 2014. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angew Chem Int Ed Engl* 53(34): 8840–8869.
- Zachary KC1, Bayne PS, Morrison VJ, Ford DS, Silver LC, Hooper DC. 2001. Contamination of gowns, gloves, and stethoscopes with vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* Sep 22(9):560-564.
- Zaman Z, Roggeman S, Cappelletti P, Ferrai G, Buxeda M, Barba N. 2001. Evaluation of Aution Max AX-4280 Automated Urine Test-Strip Analyser. *Clin Chem Lab Med* 39(7):649–657

Zhang J, Zheng B, Zhao L, Wei Z, Ji J, Li L, Xiao Y. 2014. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC Infect Dis* 14:659.

Anexos

Anexo I

Surveillance of multidrug resistant bacteria causing UTI.

V. Lykholat¹, E. Ramalheira², S. Ferreira^{2,3}; ¹University of Aveiro, Chemistry department, Aveiro/PT, ²Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE, Pathology department, Aveiro/PT, ³AWISHE, Antibiotic Resistance, Mamarrosa/PT

Background: The continuous increasing of antibiotic resistance in the last decade is a growing problem in the modern medicine. The aim of this study was to evaluate the incidence of multidrug resistant (MDR) bacteria in patients with a urinary tract infection (UTI) diagnosis, in CHBV (Centro Hospitalar do Baixo Vouga), during the first semester of 2018.

Methods: From January to June 2018, urine samples of patients diagnosed with an UTI were collected and analysed. Strains identification and susceptibility testing were performed with the automated method Vitek 2 system and Advanced Expert System (*BioMérieux*). Confirmatory methods for carbapenemase and ESBL production, such as Carba NP (*BioMérieux*) and ESBL E-test (ABbiobdisc) were used, according to the manufacturer instructions. Confirmation of colistin resistance was achieved with Micronaut kit.

Results: During the timeframe selected, a total of 1289 strains were isolated from patients with UTI diagnosis and among those 326 were MDR. The most prevalent Gram-negative species were *E. coli* (n=695), *K. pneumoniae* (n=159), *P. mirabilis* (n=81) and *P. aeruginosa* (n=68). Among Gram-positive, the most prevalent species were *E. faecalis*, *S. saprophyticus* and *S. aureus*. After susceptibility analysis, the results showed that 17,9% (n=124) of *E. coli* and 61,2% (n=97) of *K. pneumoniae* were MDR. Regarding colistin resistance, the results showed that it still low. It has been detected only in four isolates (one *E. coli* and three *K. pneumoniae*). Moreover, it was also observed that the majority of the ESBL producers, *E. coli* (68%) and *K. pneumoniae* (80%) were isolated from elderly patients (>65 years old).

Conclusions: The prevalence of ESBL and carbapenemase producers observed in elderly patients may be due long drug exposition and long-term hospitalisation. The emergence of XDR, KPC and KPC + ESBL strains is preoccupant, since there are limited options for treatment of these patients and also the possibility of cross-transmission among patients and/or health workers. The incidence of MDR bacteria is high therefore the continuous surveillance of such stains is an important goal to all health care facility. The resistance to colistin, nonetheless being low, it should be considered of utmost relevance, since colistin is one of the last resources of treatment of infections caused by MDR strains.

Table 1. Total number of isolates collected, MDR, ESBL producers, Carbapenemase producers, ESBL and carbapenemase producers

	Total of isolates	MDR	ESBL	Carbapenemase +	ESBL+ carbapenemase	XDR
Clinical Isolates	1289	326	137	11	2	11
<i>E. coli</i>	695	124	62	1	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	159	97	74	10	2	-
<i>P. mirabilis</i>	81	14	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	68	25	-	-	-	11

Anexo II

Tratamento recomendado em ITU seguido de NP nº 015/2011.

Doença	Fármaco	Duração, dias
Cistite aguda não complicada	Nitrofurantoína	5-7
	Fosfomicina	1
	Amoxicilina com ácido clavulânico	5-7
Cistite aguda não complicada ou bacteriúria assintomática nas grávidas	Fosfomicina	1
	Amoxicilina com ácido clavulânico	5-7
Pielonefrite ligeira e moderada	Ceftriaxone seguido de Cefuroxima-axetil	7-14
Pielonefrite ligeira e moderada com intolerância aos beta-lactâmicos	Levofloxacina	5
Pielonefrite grave	Ceftriaxona	Seguido de decisão clínica
Pielonefrite grave com intolerância aos beta-lactâmicos	Gentamicina Seguido de TSA	Seguido de decisão clínica

Anexo III

Perfil da resistência em isolados Gram-negativos causadores de UTU

Espécie	Total (MDR)																					
		Amicacina	Amox/Clav	Ampicillina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Cefuroxima - Axetil	Cefuroxima - Sódica	Ciprofloxacina	Fosfomicina	Gentamicina	Imipenem	Meropenem	Nitrofurantoina	Piper/Tazob	Ticarcillina	Tobramicina	Cotrimoxazol	Levofloxacina	Ertapenem
<i>E. coli</i>	695 (124)	4,0	35,7	42,9		7,1	9,4	9,4	14,3	14,3	16,3	1,3	10,6		0,1	1,9				9,1	0,1	0,2
<i>K. pneumoniae</i>	159 (97)	5,9	58,5	Ri 100		48,4	52,2	53,5	54,7	54,7	55,3	18,2	34,0		7,5	73,6	52,3			49,1	8,8	2,0
<i>P. mirabilis</i>	81 (14)	1,3	16,0	28,4		0,0	1,2	4,9	3,7	3,7	29,6	21,0	12,3		0,0	Ri 100	1,3			24,7	0,0	Ri 100
<i>P. aeruginosa</i>	68 (25)	20,6			96,9	20,6		27,9			35,3		22,1	21,2	23,5		33,8	89,2	18,2		37,9	0,0
<i>E. aerogenes</i>	16 (5)	6,3	Ri 100	Ri 100		0,0	31,3	31,3	31,3		12,5	31,3	12,5		0,0	87,5	31,3			0,0	0,0	0,0
<i>C. koseri</i>	12 (0)	0,0	0,0	Ri 100		0,0	0,0	0,0	18,2		0,0	0,0	0,0		0,0	36,4	0,0			0,0	0,0	12,5
<i>P. stuartii</i>	12 (9)	0,0	Ri 100	Ri 100		0,0	0,0	0,0	80,0		80,0	100,0	Ri 100		0,0	100,0	0,0			10,0	0,0	Ri 100

Ri – resistência intrínseca

Anexo IV

Perfil da resistência em isolados Gram-positivos causadores de UTU

Espécie	Total (MDR)	Ampicillina	Ampicil/sulbact	Clindamicina	Eritromicina	Ácido Fusídico	Gentamicina	Imipenem	Nitrofurantoína	Oxacillin MIC	Rifampicina	Estreptomicina ↑ conc	Teicoplanina	Tetraciclina	Cotrimoxazol	Vancomicina	Levofloxacina	Quinuprist/Dalfo	Mupirocina	Linezolid	Tigeciclina	Moxifloxacina	Benzylpenicilina	Daptomicina
<i>S.saprophyticus</i>	40(3)			22,5	32,5	Ri 100	0,0		0,0	27,5	0,0		0,0	12,5	7,5	0,0	2,5			5,0		2,5		0,0
<i>E. faecalis</i>	58	0,0	0,0				50,9	0,0	1,7			17,9	0,0		Ri	0,0	45,6			0,0	0,0			
<i>E. faecium</i>	18(16)	88,9					38,9	Ri 2				77,8	5,6		Ri	0,0	94,4	11,1		0,0	0,0			
<i>S. aureus</i>	19(11)			68,4	68,4	0,0	0,0			52,6	5,3		0,0	5,3	0,0	0,0	63,2		0,0	0,0		63,2	94,7	0,0

Ri – resistência intrínseca

Anexo V

Valores de RA nos isolados invasivos em Portugal disponibilizados por *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* para 2013 e 2016 (ECDC, 2017)

Espécie	Resistência e multirresistência aos vários agentes antimicrobianos	Isolados com resistência aos ANB, %		Tendência significativa no intervalo entre 2013-2016
		2013	2016	
<i>K. pneumoniae</i>	Fluoroquinolonas	35,7	41,7	↑
	Cefalosporinas de 3ª geração	37	46,7	↑
	Aminoglicosídeos	29,4	35	↑
	Cefalosporinas de 3ª geração + fluoroquinolonas + aminoglicosídeos	21,7	27,2	↑
	Carbapenemos	1-5,8	5,2	↑
	Carbapenemos + colistina	-	1	
<i>E. coli</i>	Fluoroquinolonas	31,6	28,9	↓
	Cefalosporinas de 3ª geração	14,9	16,1	
	Aminoglicosídeos	15,2	13,1	↓
	Cefalosporinas de 3ª geração + fluoroquinolonas + aminoglicosídeos	8,1	7,7	
<i>P. aeruginosa</i>	Piperacina/tazobactam	24,1	22,7	↓
	Ceftazidima	15,5	18	
	Fluoroquinolonas	23,9	20	↓
	Aminoglicosídeos	14,2	11,5	↓
	Carbapenemos	20,6	19,2	
	Combinada a três ou mais classes de antibióticos	11,9	14,8	
<i>A. baumannii</i>	Fluoroquinolonas	68,9	50,5	↓
	Carbapenemos	69	51,9	↓
	Aminoglicosídeos	56,3	39,3	↓
	Fluoroquinolonas + aminoglicosídeos + carbapenemos	56,3	37,9	↓
MRSA	Meticilina/oxacilina	46,8	43,6	↓
<i>Enterococcus spp.</i>	Gentamicina	37,2	33,8	
	Vancomicina (VRE)	22	7,5	↓