



Universidade de Aveiro
2022

Mariana Góis Campos **Relatório de Estágio: Acompanhamento de estudos internacionais de epidemiologia**

Internship Report: Follow-up of international epidemiological studies



Universidade de Aveiro
2022

Mariana Góis Campos **Relatório de Estágio: Acompanhamento de estudos internacionais de epidemiologia**

Internship Report: Follow-up of international epidemiological studies

Relatório de estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora associada com agregação do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Tânia Isabel Sousa Caetano
Investigadora Auxiliar, CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

orientadora

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

agradecimentos

Agradeço à Doutora Sónia Ferreira, que aceitou ser minha orientadora, pela disponibilidade e amabilidade que sempre demonstrou, por todos os conhecimentos e conselhos que me transmitiu ao longo deste estágio e porque sem o seu apoio e orientação o caminho até chegar aqui seria muito mais difícil.

À Mestre Amélia Rodrigues pela preocupação, simpatia e acessibilidade com que sempre me habituou e por todos os pareceres e sugestões proporcionadas.

Ao Dr. Elmano Ramalheira pela oportunidade de poder realizar este estágio no Centro Hospitalar do Baixo Vouga e pela sua disponibilidade.

À Daniela pela passagem de testemunho e pela paciência que teve para me elucidar e ajudar nas primeiras semanas de estágio, assim como, pelo apoio que sempre me ofereceu.

Ao meu namorado, por tornar os dias mais leves, pelo carinho, companheirismo e incentivo e por todas as vezes que ouviu os meus desabafos, uns mais relevantes que outros.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelas ferramentas que me deram para que pudesse chegar até aqui, pela força que me transmitiram e que tantas vezes precisei, por isso, e por todas as memórias e ensinamentos que me proporcionaram, lhes serei eternamente grata.

A todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente, o meu obrigada.

palavras-chave

Resistência a antibióticos, estudos epidemiológicos, vigilância, SMART, ATLAS, SENTRY.

resumo

A resistência aos fármacos tem gerado uma crescente preocupação de saúde pública mundial, com cerca de 700 mil pessoas a morrer a cada ano, em todo o mundo, devido a infeções causadas por agentes resistentes aos antimicrobianos, e a expectativa é que esse número aumente.

De modo a minimizar a propagação da resistência antimicrobiana é fundamental monitorizar e compreender a evolução dessas mesmas resistências e os seus mecanismos, compreensão essa, que pode ser alcançada através da realização de estudos epidemiológicos, integrados na vigilância da resistência antimicrobiana, como é o caso dos programas *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends* (SMART), *Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance* (ATLAS) e do *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*.

A elaboração do presente relatório de estágio tem como objetivo a descrição dos diferentes estudos epidemiológicos internacionais com os quais o Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV) colabora, bem como, a descrição do processo laboratorial realizado com vista a esse mesmo fim.

O laboratório de microbiologia do CHBV procede à identificação bacteriana e realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana das amostras recebidas, seguida de uma seleção dos isolados que irão integrar cada um dos estudos epidemiológicos, criopreservação dos isolados selecionados e procedimentos de envio.

Cada capítulo deste relatório de estágio é dirigido a um estudo epidemiológico distinto, nos quais pode encontrar-se uma breve descrição de cada estudo, os seus objetivos e as suas especificações, onde estão incluídos o material fornecido, a quantidade e tipo de isolados solicitados.

Através da colaboração de diversos centros de recolha, estes programas auxiliam o desenvolvimento de novos medicamentos, fornecendo dados que permitem detetar o surgimento de novos fenótipos e mecanismos de resistência, prever tendências de resistência, monitorizar o impacto da introdução de novos agentes antimicrobianos na prática clínica, identificar surtos e estabelecer medidas de controlo de infeção e saúde pública.

Como conclusão e a nível particular, foi possível ficar com uma visão geral da epidemiologia que afeta a região de Aveiro, a qual é partilhada no fim deste relatório de estágio.

keywords

Antibiotic resistance, epidemiology studies, surveillance, SMART, ATLAS, SENTRY.

abstract

Drug resistance has generated a growing public health concern worldwide, with around 700,000 people dying each year worldwide from infections caused by antimicrobial-resistant agents, and this number is expected to increase.

In order to combat the spread of antimicrobial resistance, it is essential to monitor and understand the evolution of these same resistances and their mechanisms, an understanding that can be achieved by carrying out epidemiological studies, integrated in the surveillance of antimicrobial resistance, as is the case of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) and the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.

The purpose of this internship report is to describe the different international epidemiological studies with which the Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV) collaborates, as well as the description of the laboratory process carried out for the same purpose.

The CHBV microbiology laboratory proceeds with the bacterial identification and performance of antimicrobial susceptibility tests of the samples received, followed by a selection of the isolates that will integrate each of the epidemiological studies, cryopreservation of the selected isolates and shipping procedures.

Each chapter of this internship report is directed to a different epidemiological study, in which you can find a brief description of each study, its objectives and its specifications, including the material provided, the quantity and type of isolates requested.

Through the collaboration of several collection centers, these programs help the development of new drugs, providing data that allow detecting the emergence of new resistance phenotypes and mechanisms, predicting resistance trends, monitoring the impact of the introduction of new antimicrobial agents in clinical practice, identify outbreaks and establish infection control and public health measures.

As a conclusion and at a particular level, it was possible to get an overview of the epidemiology that affects the region of Aveiro, which is shared at the end of this internship report.

Índice

Índice.....	i
Índice de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	v
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Resistência antimicrobiana, o seu impacto em Portugal e no Mundo	2
1.2. Estudos epidemiológicos	5
1.3. Programas de vigilância da resistência antimicrobiana	5
1.4. Antibióticos	6
1.5. Resistência aos antibióticos.....	10
1.5.1. Resistência bacteriana por classe de antibióticos.....	12
1.6. Microrganismos emergentes	16
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1. Caracterização da entidade de acolhimento	21
3.2. Colheita de produtos biológicos.....	21
3.3. Identificação bacteriana	22
3.4. Testes de susceptibilidade antimicrobiana	24
3.5. Seleção de isolados	26
3.6. Criopreservação de estirpes.....	26
3.7. Preparação do envio.....	27
4. Capítulo I - <i>Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i>	29
4.1. Contextualização do estudo epidemiológico.....	30
4.2. Objetivos.....	32
4.2.1. Zerbaxa	32
4.2.2. Ertapenemo.....	34
4.3. Materiais fornecidos	36
4.4. Seleção de isolados	36
4.4.1. Critérios de inclusão	36
4.4.2. Critérios de exclusão.....	37
4.5. <i>Requisition Forms</i>	38

4.6.	Envio.....	39
5.	Capítulo II - <i>Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance</i>	40
5.1.	Contextualização do estudo epidemiológico.....	41
5.2.	Objetivos.....	42
5.2.1.	Tigeciclina	43
5.2.2.	Linezolida	44
5.2.3.	Ceftarolina	46
5.2.4.	Ceftarolina/Avibactam.....	47
5.2.5.	Ceftazidima/Avibactam	48
5.3.	Materiais fornecidos	49
5.4.	Seleção de isolados	50
5.4.1.	Critérios de inclusão	50
5.4.2.	Critérios de exclusão.....	51
5.5.	<i>Requisition Forms</i>	51
5.6.	Envio.....	53
6.	Capítulo III - <i>Sentry Antimicrobial Surveillance Program</i>	54
6.1.	Contextualização do estudo epidemiológico.....	55
6.2.	Objetivos.....	56
6.3.	Materiais fornecidos	57
6.4.	Seleção de isolados	57
6.4.1.	Critérios de Inclusão	58
6.4.2.	Critérios de Exclusão	59
6.5.	Formulários	59
6.6.	Envio.....	59
7.	Conclusão	61
8.	Referências	64
	Anexos	75
	Anexo 1: Manual de procedimentos de preparação dos isolados para o envio, disponibilizado pelo SMART	76
	Anexo 2: Exemplo de um <i>Requisition Form</i> do SMART.....	83
	Anexo 3: Exemplo de um <i>Requisition Form</i> do ATLAS.....	84
	Anexo 4: Exemplo de um formulário do SENTRY (categoria D).	85

Índice de figuras

Figura 1 - Previsão do número de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana por ano em 2050.....	3
Figura 2 - Mecanismos de ação dos antibacterianos e as suas categorias	10
Figura 3 - Possíveis mecanismos de resistência adotados por bactérias.....	12
Figura 4 - Esquema do fluxo de trabalho incorporado no âmbito dos estudos epidemiológicos internacionais.	22
Figura 5 - Esquematização dos princípios da técnica de MALDI-TOF MS	24
Figura 6 - Logótipo do <i>Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i>	30
Figura 7 - Logótipo do <i>Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance</i>	41
Figura 8 - Logótipo do <i>Sentry Antimicrobial Surveillance Program</i>	55

Índice de tabelas

Tabela 1 - Lista de patógenos prioritários segundo a OMS	17
Tabela 2 - Microrganismos suscetíveis ao Zerbaxa por cada tipo de infecção, tanto <i>in vitro</i> , como em contexto de infecção clínica.	33
Tabela 3 - Microrganismos suscetíveis ao Invanz por cada tipo de infecção, tanto <i>in vitro</i> , como em contexto de infecção clínica.	35
Tabela 4 - Microrganismos suscetíveis ao Tygacil por cada tipo de infecção, tanto <i>in vitro</i> , como em contexto de infecção clínica.	44
Tabela 5 - Microrganismos suscetíveis ao Zyvox por cada tipo de infecção, tanto <i>in vitro</i> , como em contexto de infecção clínica.	46
Tabela 6 - Microrganismos suscetíveis ao Zinforo por cada tipo de infecção, tanto <i>in vitro</i> , como em contexto de infecção clínica.	47
Tabela 7 - Microrganismos suscetíveis ao Zavicefta por cada tipo de infecção, tanto <i>in vitro</i> , como em contexto de infecção clínica.	49

Lista de abreviaturas

ATLAS	<i>Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance</i>
AWARE	<i>Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance and Evaluation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHBV	Centro Hospitalar do Baixo Vouga
CLED	Cistina, Lactose, Deficiência electrolítica
CMI	Concentração mínima inibitória
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
DHD	Doses diárias por mil habitantes
DHFR	Enzima di-hidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESBL	β -lactamases de espectro alargado
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIP	Hospital Infante D. Pedro
IHMA	<i>International Health Management Associates</i>
INFORM	<i>International Network for Optimal Resistance Monitoring</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>

MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBPs	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PPCIRA	Programa Nacional para a Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SMART	<i>Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i>
SNS	Sistema Nacional de Saúde
TEST	<i>Tigecycline Evaluation Surveillance Trial</i>
tRNA	RNA transportador
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

1. Introdução Geral

1.1. Resistência antimicrobiana, o seu impacto em Portugal e no Mundo

A intensa pressão na escolha dos antibióticos utilizados, responsável por um aumento notável na evolução e disseminação de genes resistentes em bactérias (Liu *et al.*, 2016), bem como o decréscimo no investimento e na inovação associada ao desenvolvimento de novos antibióticos, estão a colocar em risco a nossa capacidade de combater um número crescente de infeções (Organização Mundial da Saúde, 2020). Posto isto, a resistência aos fármacos representa cada vez mais um desafio no controlo de infeções bacterianas na população, sendo as bactérias multiresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) cada vez mais observadas (Liu *et al.*, 2016).

Este problema tem levantado uma urgente preocupação de saúde pública global. A resistência antimicrobiana pode, também, ser adquirida através da cadeia alimentar ou do meio ambiente, através da água, ar ou solo, por exemplo (Ma *et al.*, 2021). Embora os antimicrobianos sejam suplementos frequentemente utilizados na alimentação animal, necessários à manutenção da saúde e produtividade dos animais, o seu uso excessivo na alimentação do gado levou, também, a um aumento da resistência dos microrganismos a antimicrobianos (Ma *et al.*, 2021). O acumular de evidências sugere que a resistência e as respostas evolutivas dos microrganismos aos tratamentos com antibióticos não devem ser encaradas apenas como uma característica da espécie bacteriana individual, visto que a resposta das bactérias aos antibióticos é significativamente alterada pela presença e interação com outros microrganismos (Bottery *et al.*, 2021).

Segundo um estudo divulgado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), em Portugal, entre 2015 e 2050 prevê-se uma mortalidade anual, em média, de 11,3 mortes por cada 100 mil habitantes devido a infeções causadas por bactérias muito resistentes, levando a uma média anual de mais de 1.100 mortes (Diário de Notícias, 2018).

De forma a corroborar a previsão da OCDE, e com base nos dados apresentados no *Dashboard* da Mortalidade dos Residentes em Portugal, disponibilizado pela Direção-Geral da Saúde, verificamos um aumento progressivo do número de mortes associadas a “algumas doenças infecciosas e parasitárias” entre 2015 e 2018 (não são apresentados dados

posteriores a 2018), sendo estas doenças, responsáveis por 2044 mortes nesse último ano (Direção-Geral da Saúde, 2018; Instituto Nacional de Estatística, s.d.). De acordo com Jim O'Neill (2014), cerca de 700 mil pessoas, em todo o mundo, morrem a cada ano por infecções causadas por agentes resistentes aos antimicrobianos, e a expectativa é que aumente para 10 milhões por ano até 2050 (Figura 1) (O'Neill, 2014).

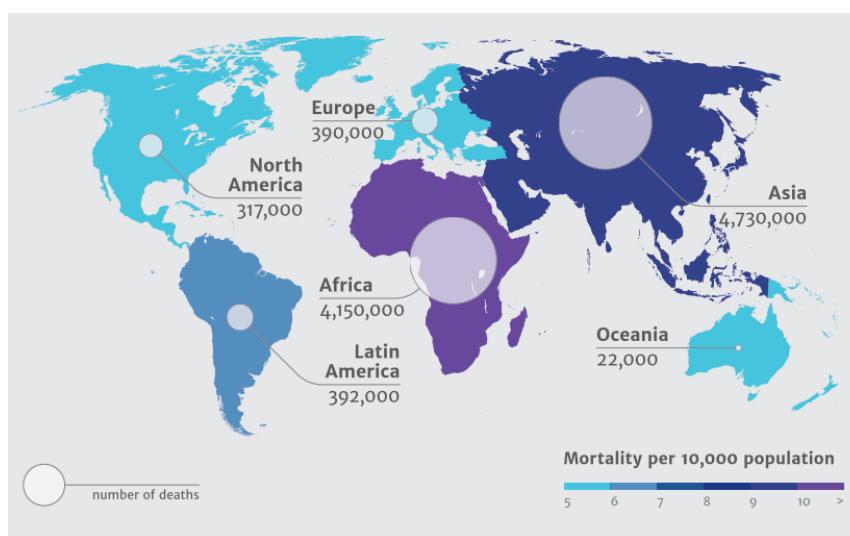


Figura 1 - Previsão do número de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana por ano em 2050. Fonte: O'Neill, 2014.

Face a este problema, em Portugal, e de modo a travar o avanço dos microrganismos MDR e XDR, em 2016, o Programa Nacional para a Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA), propôs quatro metas de saúde para 2020, as quais incluíam: reduzir o consumo de antibióticos na comunidade (abaixo de 19 doses diárias por mil habitantes - DHD); manter a taxa de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenemos inferior a 6%; reduzir a prevalência de infecções adquiridas em meio hospitalar abaixo de 8% e reduzir a prevalência de infecções adquiridas em cuidados continuados abaixo de 10% (Diário da República, 2016). Já em 2020, no Relatório Anual - Acesso a Cuidados de Saúde nos Estabelecimentos do Sistema Nacional de Saúde (SNS) e Entidades Convencionadas, podemos comprovar os resultados atingidos nesse mesmo ano. Durante o decorrer do ano 2020 cumpriu-se a tendência de melhoria na densidade de incidência de algumas tipologias de infecções associadas a cuidados de saúde, nomeadamente de pneumonia associada ao ventilador e de bacteremia associada à utilização de cateter venoso central (SNS e Convencionadas, 2020). No entanto, é

necessário um maior investimento na prevenção de infeções aquando das cirurgias de cólon/reto, cuja previsão para 2022, é de aumento. O consumo hospitalar de carbapenemos manteve a sua tendência decrescente dos últimos cinco anos, com variação de 12% face a 2019. Na mesma linha, também o consumo de quinolonas teve uma progressiva e sustentada redução, assistindo-se a uma melhoria global das resistências a antibióticos dos principais microrganismos estudados, exceto na família *Enterobacteriaceae* com baixa suscetibilidade aos carbapenemos, que tem vindo a disseminar-se (SNS e Convencionadas, 2020). Relativamente ao consumo de antimicrobianos na comunidade, entre 2018 e 2019, verificou-se um aumento de 17,7 para 17,9 DHD, no consumo de antimicrobianos de utilização sistémica e a redução do consumo de fluoroquinolonas (de 1,7 para 1,5 DHD). Relativamente ao consumo de antimicrobianos a nível hospitalar, evidencia-se uma redução de 8% no consumo de carbapenemos (SNS e Convencionadas, 2020). Já em 2020 e de uma forma geral, Portugal reduziu o seu consumo de antibióticos, passando a consumir 13,7 DHD (Penela, 2021).

Apesar das metas atingidas em 2020, e dos esforços mobilizados para combater este problema crescente, o uso excessivo e incorreto de antibióticos na Saúde e na agricultura, juntamente com a inadequada gestão dos resíduos e transmissão ambiental, continuam a contribuir para um aumento significativo da resistência a antimicrobianos (Miethke *et al.*, 2021). Com o aparecimento da pandemia de COVID-19, o elevado número de infeções secundárias, frequentemente associadas a bactérias multirresistentes, observadas em pacientes hospitalizados ou com um sistema imune debilitado, tem sido alvo de esquecimento por parte da comunidade científica. Para agravar ainda mais a situação atual, acrescenta-se o consumo massivo de antibióticos que todos os dias estão a ser utilizados como tratamento complementar da COVID-19 em todo o mundo, consumo esse, que num futuro próximo contribuirá, ainda mais, para o aparecimento contínuo das resistências aos antibióticos e por conseguinte, sequelas clínicas, económicas e sociais (Miethke *et al.*, 2021).

Atualmente apenas 30 a 40 novos compostos antibacterianos estão em desenvolvimento, e destes, menos de 25% representam uma nova classe ou atuam por intermédio de um novo mecanismo, sendo que nenhum deles é potencialmente ativo contra as bactérias ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) Gram-negativas ou microrganismos de ameaça crítica definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Apenas uma pequena parte dos antibióticos aprovados nos últimos 40 anos representa novas classes de compostos, a nova classe de antibióticos mais recente foi descoberta durante os anos 80, tornando o investimento em novas opções terapêuticas urgentemente necessário (Miethke *et al.*, 2021).

1.2. Estudos epidemiológicos

Para combater com eficácia a propagação da resistência antimicrobiana através do desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, é fundamental compreender como as bactérias se têm adaptado e evoluído para sobreviver aos antibióticos existentes. Para entender totalmente a evolução dessas mesmas resistências, devemos estudar o seu surgimento e os seus mecanismos (Bottery *et al.*, 2021). Essa compreensão pode ser alcançada através da realização de estudos epidemiológicos, integrados na vigilância da resistência antimicrobiana, que visam rastrear as tendências de resistência em vastas áreas geográficas e por longos períodos de tempo. Estes estudos globais são ideais para monitorizar e avaliar a atividade de novos compostos antibacterianos, especialmente na avaliação longitudinal e comparativa de populações de agentes patogênicos dos diferentes centros demográficos e geográficos.

1.3. Programas de vigilância da resistência antimicrobiana

Os programas de vigilância da resistência antimicrobiana figuram uma importante ferramenta no planeamento de estratégias para monitorizar resistências antimicrobianas emergentes (Castanheira, 2020). Estes programas podem ser de duas naturezas distintas:

- **Programas de saúde pública**, que se concentram maioritariamente nos cuidados de saúde e no controlo de infeções, como o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Sendo alguns dos seus objetivos, medir o impacto dos esforços de prevenção e diminuir a incidência de infeções associadas aos cuidados de saúde (Castanheira, 2020).
- **Programas patrocinados por indústrias**, que se concentram na análise de fármacos em desenvolvimento ou recentemente aprovados (Sader *et al.*, 2019).

Neste trabalho vamos dar destaque aos programas de vigilância da resistência antimicrobiana patrocinados por indústrias farmacêuticas, como é o caso do *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends* (SMART), patrocinado pela Merck; *Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance* (ATLAS), patrocinado pela Pfizer; e por laboratórios internacionais de recolha de estirpes como o caso do *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*, que, contrariamente aos programas de saúde pública (que recolhem dados clínicos), recolhem microrganismos, com os quais irão realizar diversos testes laboratoriais.

Os programas patrocinados por indústrias são desenhados com vista ao cumprimento dos requisitos definidos pelas agências reguladoras, responsáveis pela aprovação comercial de agentes antimicrobianos, como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) (Castanheira, 2020). É exigida às empresas farmacêuticas a vigilância pré-comercialização, onde é avaliada a atividade *in vitro*, do agente antimicrobiano, contra uma coleção de bactérias relevantes, no início do desenvolvimento clínico, bem como, a vigilância pós-comercialização para avaliar a potência, o espectro e o surgimento de resistências ao longo do tempo (5 ou mais anos) após aprovação clínica e introdução no mercado do agente antimicrobiano (Sader *et al.*, 2019).

1.4. Antibióticos

A atividade de um antibiótico é definida em função do modo como atua no desenvolvimento da população bacteriana, podendo assim, ter uma atividade bacteriostática, quando inibe a multiplicação das células bacterianas deixando a eliminação dos microrganismos a cargo do sistema imunitário do hospedeiro, ou bactericida, quando para além de inibir a multiplicação, induz a morte dessas mesmas células (Bayarski, 1928). Um mesmo antibiótico pode ter uma atividade bacteriostática para algumas bactérias e ter um efeito bactericida para outras, dependendo da sua concentração e local de infeção, por exemplo.

A eficácia, e conseqüente êxito terapêutico, irá depender muito da escolha do agente a empregar, escolha essa que deve ter em consideração algumas especificações relativas ao microrganismo envolvido, como resistências intrínsecas e adquiridas que possa apresentar, ao paciente (reações de hipersensibilidade, por exemplo) e patologias a ele associadas e às

próprias características do antibiótico, tais incluem, os factores farmacocinéticos. Escolhido um determinado antibiótico e antes deste ser administrado, é importante aferir se o microrganismo em causa é sensível ou resistente à sua ação, esta classificação pode ser alcançada através da concentração máxima no soro.

Diferentes antibióticos, podem apresentar diferentes mecanismos de ação (Figura 2), através dos quais são classificados:

Inibição da síntese de parede celular: a parede celular das células bacterianas é constituída por peptidoglicano, este peptidoglicano sofre uma reticulação, pela ação das transglicosidasas, as cadeias peptídicas estendem-se de forma a criar ligações cruzadas, e posteriormente, a porção D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica é reticulada por resíduos de glicina na presença de proteínas de ligação à penicilina (PBPs), de modo a fortalecer a parede celular (Kappor *et al.*, 2017). A ação dos antibióticos inibidores da síntese de parede celular vai impedir a formação de peptidoglicano e promover a ativação de autolisinas endógenas, provocando a lise da célula bacteriana. Dentro deste grupo, estão os antibióticos β -lactâmicos e os glicopeptídeos (Kappor *et al.*, 2017).

Compreendidos na classe dos antibióticos β -lactâmicos, estão: penicilinas naturais ou semisintéticas, cefalosporinas (e cefeminas), carbapenemos e monobactâmicos. Todos estes antibióticos possuem um anel β -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de azoto, nas suas diferentes estruturas moleculares (Santana, 2018). Esse anel mimetiza a porção D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica, o que irá fazer com que as PBPs se liguem a ele, deixando de estar disponíveis para a síntese de peptidoglicano. Já os glicopeptídeos que apenas atuam perante as bactérias Gram-positivas, irão ligar-se à porção D-alanil-D-alanina impedindo a sua ligação as PBPs, inibindo assim, a síntese de parede celular. Nos glicopeptídeos estão incluídos antibióticos como a vancomicina, teicoplanina e telavancina (Kappor *et al.*, 2017).

Inibição da síntese proteica: a biossíntese de proteínas é catalisada por ribossomas aquando do processo de tradução. Os antibióticos inibidores desta biossíntese vão actuar nos ribossomas 70s bacterianos, tendo como alvos as subunidades ribossomais 30s ou 50s (Kappor *et al.*, 2017).

Os aminoglicosídeos e as tetraciclina fazem parte desta classe de antibióticos, capazes de inibir a subunidade 30s. Os aminoglicosídeos ligam-se à membrana externa das

bactérias Gram-negativas, essa ligação leva à formação de grandes poros, permitindo a penetração do antibiótico no interior da bactéria (Bayarski, 1928). Estes antibióticos interagem com o 16S rRNA da subunidade 30s através de ligações de hidrogénio, o que irá causar a terminação prematura da tradução do mRNA. As tetraciclinas têm um espectro de ação amplo (Bayarski, 1928), atuam sobre as sequências conservadas do 16S rRNA de modo a evitar a ligação do tRNA ao sítio A (Kappor *et al.*, 2017).

Responsáveis pela interação com a subunidade 50s estão antibióticos como o cloranfenicol, macrolídeos e oxazolidinonas. O cloranfenicol interage com as sequências conservadas do 23S rRNA da subunidade 50s, evitando a ligação do tRNA ao sítio A do ribossoma, e como consequência, inibindo a síntese proteica (Kappor *et al.*, 2017). Os macrolídeos (grupo onde está incluída a claritromicina) afetam a translocação, o que resulta numa separação prematura de cadeias peptídicas incompletas (Kappor *et al.*, 2017), a sua ação é principalmente bacteriostática, mas também pode ser bactericida em altas concentrações (Bayarski, 1928). As oxazolidinonas interferem com a síntese proteica em várias etapas: inibem a síntese proteica pela ligação ao 23S rRNA da subunidade 50s, suprimem a inibição 70s e interagem com o peptidil-tRNA (Kappor *et al.*, 2017). De um modo geral, não afetam a síntese proteica das células eucariotas (ribossomas 80s, com subunidades 40s e 60s), excepto o cloranfenicol que actua a nível mitocondrial, e por esse motivo o seu uso deve ser condicionado.

Inibição da síntese de ácidos nucleicos: a replicação do DNA bacteriano depende da ação da DNA-helicase, que separa a dupla-hélice de DNA de modo a permitir que a DNA-polimerase exerça a sua função. Após a ação da DNA-helicase, ocorre a formação de superespirais positivas no DNA em frente à forquilha de replicação, se este decurso não for interrompido, impede a continuidade do processo. De modo a que a replicação não seja descontinuada, a enzima DNA-girase introduz superespirais negativas no DNA bacteriano possibilitando a continuidade da replicação (Nogueira *et al.*, 2016). Esta enzima é constituída por duas subunidades A e duas subunidades B. A subunidade A realiza o corte do DNA enquanto a subunidade B introduz superenrolamentos negativos e, em seguida, a subunidade A volta a selar as cadeias (Kappor *et al.*, 2017).

As quinolonas e fluoroquinolonas representam uma classe de fármacos sintéticos, quimicamente semelhantes, que manifestam este mecanismo de ação (Nogueira *et al.*, 2016). As fluoroquinolonas interagem com elevada afinidade à subunidade A da DNA-

girase, interferindo na sua função de corte e selagem das cadeias. Em bactérias Gram-positivas, o principal alvo de ação destes antibióticos é a topoisomerase IV, que corta e separa a cadeia de DNA descendente após a replicação do DNA (Kappor *et al.*, 2017).

As células eucariotas não possuem as duas enzimas referidas, mas sim uma topoisomerase II, que apresenta uma afinidade muito baixa para as fluoroquinolonas, e por este motivo, este antibiótico tem baixa toxicidade para as células humanas e animais (Kappor *et al.*, 2017).

Também integradas nesta classe de antibióticos, as rifamicinas, inibem a ação da RNA polimerase, impedindo a transcrição do DNA e formação de mRNA (Kappor *et al.*, 2017).

Alteração da função da membrana citoplasmática: as polimixinas são os principais antibióticos desta categoria. As suas moléculas anfipáticas, constituídas por uma cadeia lateral de ácidos gordos, ligada a um anel peptídico policatiônico, composto por oito a dez aminoácidos, interagem com os lipopolissacarídeos da membrana da célula bacteriana (Nogueira *et al.*, 2016). Ao atuar sobre as membranas bacterianas, diversas moléculas de cálcio e magnésio responsáveis pela estabilidade da membrana, são removidas. Essa desestabilização promove o aumento da permeabilidade e extravasamento dos componentes celulares, levando à morte celular do microrganismo (Nogueira *et al.*, 2016).

Atividade antimetabólica: antibióticos que bloqueiam vias biossintéticas por antagonismo competitivo, como é o caso das sulfonamidas e da trimetoprima que inibem etapas distintas do metabolismo do ácido fólico (Kappor *et al.*, 2017). Vários microrganismos têm necessidade de sintetizar folatos, visto que são impermeáveis a estas moléculas, não conseguindo captá-los do meio exterior (Nogueira *et al.*, 2016). Os derivados do ácido fólico desempenham funções de cofator essencial a enzimas participantes na síntese de purinas, pirimidinas, timidinas e aminoácidos (Nogueira *et al.*, 2016).

A combinação dos dois agentes referidos demonstra uma taxa de mutação, responsável por resistência, reduzida (Kappor *et al.*, 2017). As sulfonamidas inibem a síntese de ácido fólico competindo com o substrato natural, ácido p-aminobenzóico, pela enzima di-hidropteroato sintetase e, deste modo, atuam como bacteriostáticos (Nogueira *et al.*, 2016). Já a trimetoprima, atua numa fase posterior da síntese, inibindo a enzima di-

hidrofolato redutase bacteriana (Kappor *et al.*, 2017), enzima que catalisa a conversão do ácido di-hidrofólico em ácido tetra-hidrofólico, atuando também como um fármaco bacteriostático (Nogueira *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que não existe nenhum antibiótico inócuo para o hospedeiro, todos eles podem desencadear efeitos secundários (Bayarski, 1928). Um antibiótico ideal deveria ter capacidade de seleção, capacidade essa, baseada nas diferenças entre células procariontas e eucariontas, ser mais bactericida do que bacteriostático e não induzir resistências.

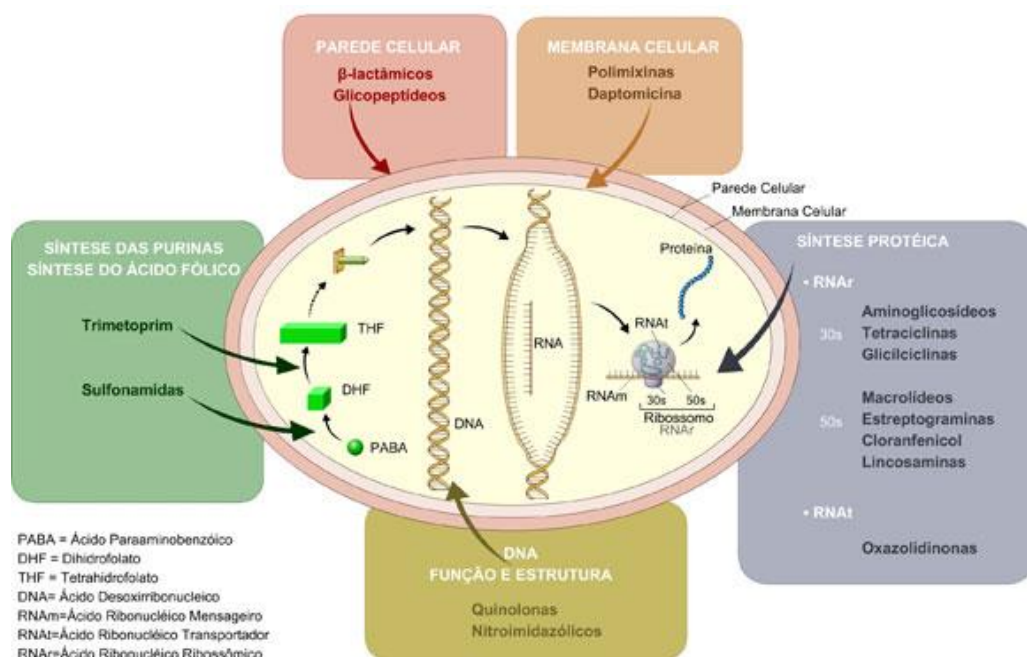


Figura 2 - Mecanismos de ação dos antibacterianos e as suas categorias. Fonte: Faria *et al.*, 2021.

1.5. Resistência aos antibióticos

A resistência bacteriana é caracterizada como a aptidão das células bacterianas em impedir os efeitos bacteriostáticos ou bactericidas dos antibióticos (Hasan & Al-Harmoosh, 2020). Dependendo dos mecanismos que conduzem a essa capacidade, as resistências são classificadas em três grupos: resistência intrínseca, adquirida e adaptativa.

A resistência intrínseca é a capacidade inata de uma certa espécie bacteriana resistir à atividade de um agente antimicrobiano em particular, através da falta de afinidade do medicamento pela bactéria, inacessibilidade à célula bacteriana ou extrusão do

medicamento por moléculas com capacidade de exportação ativa, podendo ser definida como uma característica compartilhada universalmente dentro da mesma espécie bacteriana, independente da exposição prévia a antibióticos (Reygaert, 2018; Liu *et al.*, 2016; Wyres & Holt, 2018). A resistência adquirida ocorre quando uma determinada bactéria adquire a capacidade de resistir à atividade de um determinado antimicrobiano ao qual era suscetível anteriormente, a aquisição pode ser temporária ou permanente (Reygaert, 2018). Este fenómeno pode resultar da aquisição de genes de resistência transferidos horizontalmente entre diferentes estirpes ou mesmo entre diferentes espécies, via conjugação e/ou mutação em certos genes envolvidos em processos fisiológicos normais e estruturas celulares (Liu *et al.*, 2016; Wyres & Holt, 2018). A resistência adaptativa que ocorre quando a população bacteriana é sujeita a aumentos graduais dos níveis de concentração de antibióticos, é caracterizada por um surgimento rápido. A resistência adaptativa pode exigir herança epigenética e modificação dos padrões de expressão genética na população bacteriana (Liu *et al.*, 2016).

Nos dias de hoje, podemos verificar um desenvolvimento preocupante na quantidade de infeções contraídas pelo aparecimento de estirpes MDR, XDR e *pandrug-resistant* (PDR) (Magiorakos *et al.*, 2012). Segundo Magiorakos *et al.*, (2012), as bactérias MDR manifestam resistência adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas, as XDR são resistentes a pelo menos um agente em todas, exceto uma ou duas categorias antimicrobianas, já as bactérias PDR são resistentes a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos, ou seja, são resistentes a todos os antimicrobianos existentes.

As bactérias podem apresentar diversos mecanismos de resistência (Figura 3), entre os mais vulgares, podem inativar enzimaticamente a ação dos antibióticos, reduzir a permeabilidade das suas membranas interna e externa, accionar sistemas de bombas de efluxo ou servir-se de vias metabólicas alternativas de modo a bloquear o efeito do antibiótico empregue (Hasan & Al-Harmoosh, 2020).

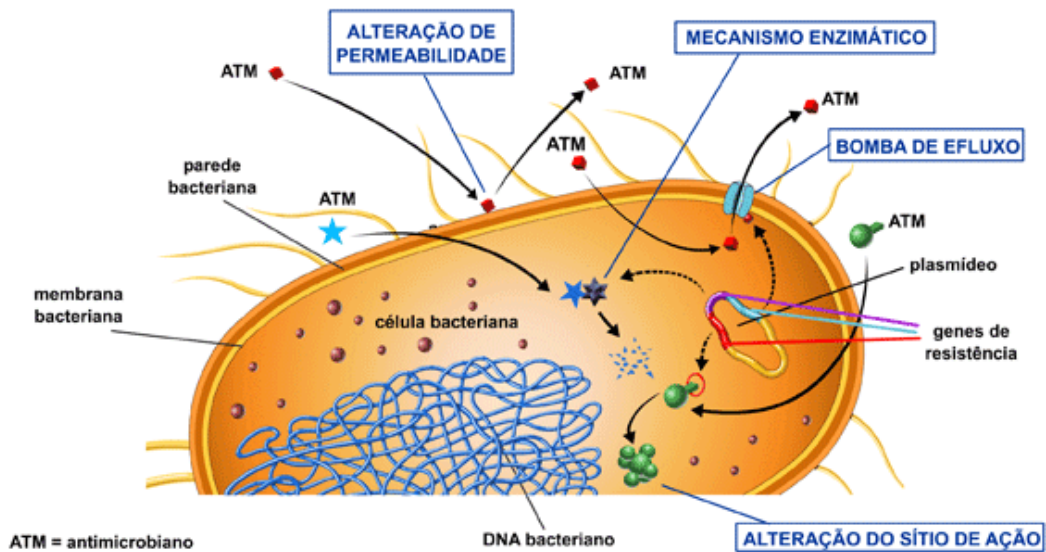


Figura 3 - Possíveis mecanismos de resistência adotados por bactérias. ATM: antimicrobiano Fonte: Centerlab, 2020.

1.5.1. Resistência bacteriana por classe de antibióticos

β -lactâmicos: são quatro os principais mecanismos através dos quais as células bacterianas conseguem evitar o efeito dos antibióticos β -lactâmicos. Estes mecanismos incluem alterações no local ativo nas PBPs, o que leva a uma redução da afinidade a este tipo de antimicrobiano; alteração nas proteínas de membrana, responsável pela diminuição de difusão do fármaco para o interior da célula; ativação de bombas de efluxo e intervenção enzimática. Sendo este último, o mecanismo mais comum (Bonomo, 2017).

As β -lactamases são enzimas hidrolisantes amplamente prevalentes que utilizam moléculas de água estrategicamente posicionadas para hidrolisar o anel β -lactâmico e inativar o antibiótico antes que ele possa atingir o seu alvo (Bonomo, 2017; Kappor *et al.*, 2017; E. Peterson & Kaur, 2018). Estas enzimas são classificadas de acordo com dois sistemas de classificação principais: Ambler (molecular) e Bush-Jacoby (funcional) (Kappor *et al.*, 2017). A classificação mais utilizada é a classificação de Ambler, onde as β -lactamases são divididas em quatro classes (A, B, C e D) com base nas suas sequências de aminoácidos (Hall & Barlow, 2005). As enzimas pertencentes às classes A, C e D são designadas serino- β -lactamases (têm uma serina no centro ativo), são suficientemente diferentes para que não sejam encontradas similaridades de sequência, mas a sua semelhança estrutural torna evidente a sua descendência proveniente de um ancestral

comum (Hall & Barlow, 2005). Na classe B estão incluídas enzimas com origens evolutivas independentes do ascendente das restantes classes, nesta classe as enzimas são denominadas metalo- β -lactamases (Hall & Barlow, 2005).

- **β -lactamases de classe A**

Este grupo inclui uma ampla variedade de enzimas, por exemplo: β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), TEM, SHV, CTX-M e carbapenemases (KPC, GES, IMI, SME), frequentemente codificadas em plasmídeos (Bonomo, 2017; Hasan & Al-Harmoosh, 2020). Em geral, as β -lactamases desta classe são susceptíveis à inativação pelos inibidores de β -lactamases clinicamente disponíveis (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam e avibactam) e são frequentemente indutíveis, ou seja, são produzidas na presença de altos níveis de antibióticos β -lactâmicos (Bonomo, 2017; Hasan & Al-Harmoosh, 2020). As ESBLs são produzidas principalmente por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Hasan & Al-Harmoosh, 2020).

- **β -lactamases de classe B**

As metalo- β -lactamases degradam os antibióticos β -lactâmicos na presença de um cofator de metal (zinco). Os microrganismos produtores destas enzimas apresentam, geralmente, resistência às penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e aos inibidores de β -lactamases clinicamente disponíveis. Esta classe inclui enzimas geograficamente difundidas, como é o caso das enzimas IMP, VIM e NDM, cuja expressão deriva de genes presentes no cromossoma bacteriano, em plasmídeos ou integrações (Bonomo, 2017). Observadas em espécies de *Aeromonas* e *Legionella* (Hasan & Al-Harmoosh, 2020).

- **β -lactamases de classe C**

Este grupo é caracterizado por enzimas codificadas por genes localizados no cromossoma bacteriano, conhecidas como AmpC (Hasan & Al-Harmoosh, 2020). Este mecanismo de resistência é geralmente induzível, mas uma mutação pode levar à superexpressão destas β -lactamases (Harris, 1964; Hasan & Al-Harmoosh, 2020). São muitas vezes encontradas em bactérias Gram-negativas, tais como, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* (Hasan & Al-Harmoosh, 2020).

- **β -lactamases de classe D**

Familiarmente conhecidas como OXA β -lactamases, devido à sua capacidade de hidrolisar rapidamente a oxacilina, em contraste com as demais classes (Bonomo, 2017; Hall & Barlow, 2005), as enzimas desta classe são produzidas por cocos Gram-positivos, como é o caso do *Staphylococcus aureus* (Hasan & Al-Harmoosh, 2020). São relatadas mais de 490 tipos de oxacilinases, sendo a sua maioria insensível à inibição por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Bonomo, 2017).

Glicopeptídeos: a vancomicina e a teicoplanina são os dois glicopeptídeos mais utilizados na prática clínica (Harris, 1964). A resistência à vancomicina teve origem na produção de precursores de peptidoglicano modificados, D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, com os quais os glicopeptídeos apresentam baixa afinidade. Os operões responsáveis por esta alteração podem estar presentes em plasmídeos, ou nos cromossomas (Sultan et al., 2018). Espécies bacterianas do género *Enterococcus* apresentam, frequentemente, resistência a este antimicrobiano (Shrivastava et al., 2018).

Aminoglicosídeos: as bactérias resistentes a esta categoria antimicrobiana podem munir-se de dois mecanismos de resistência diferentes, através da expressão de enzimas modificadas: acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases, de origem plasmídica (Harris, 1964; Hasan & Al-Harmoosh, 2020; Sultan et al., 2018); ou através de alterações do alvo ribossomal, desencadeadas por mutações no gene 30s ribossomal da bactéria. Estes dois mecanismos são responsáveis pelo alto grau de resistência dos *Enterococcus* à gentamicina e à estreptomicina, respetivamente (Hasan & Al-Harmoosh, 2020).

Tetraciclínas: os microrganismos podem desenvolver resistência às tetraciclínas através da redução da permeabilidade da sua membranas, redução essa, desencadeada por mutações cromossómicas espontâneas (Hasan & Al-Harmoosh, 2020); por intermédio de bombas de efluxo dependentes de energia (Sultan et al., 2018) ou da modificação do ribossoma (alvo da tetraciclina). Este último mecanismo é encontrado em diversos géneros bacterianos, como é o caso das bactérias *Campylobacter*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Bacteroides*, por exemplo (Hasan & Al-Harmoosh, 2020). Para além destes, mais de 60% dos isolados de *Shigella flexneri*, 90% das estirpes de *Staphylococcus aureus* resistente à

metecilina (MRSA) e 60% de *Streptococcus pneumoniae* multirresistente são, atualmente, resistentes à tetraciclina (Harris, 1964).

Macrolídeos, Lincosamidas, Estreptograminas: as bactérias Gram-negativas manifestam resistência intrínseca a estes grupos de antibióticos devido à barreira de permeabilidade da sua membrana externa (Harris, 1964; Hasan & Al-Harmoosh, 2020). Já as bactérias Gram-positivas podem apresentar uma mudança estrutural no alvo ribossomal, reduzindo a ligação do rRNA ao fármaco (mecanismo encontrado em *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*), ou ainda, inativar o mesmo, por meio de atividade enzimática (Hasan & Al-Harmoosh, 2020; Kappor *et al.*, 2017).

Cloranfenicol: a inativação deste antibiótico pode dever-se à acetilação a que é sujeito, causada por cloranfenicol acetiltransferases, demonstrada em *Streptococcus pneumoniae* (Hasan & Al-Harmoosh, 2020; Kappor *et al.*, 2017), à redução da absorção do fármaco, inativação por fosfotransferases, mutação do local alvo ou bombas de efluxo (Sultan *et al.*, 2018).

Quinolonas: a resistência adquirida às quinolonas é relatada em diversas espécies bacterianas e pode dever-se a uma diminuição da afinidade do fármaco ao alvo (topoisomerase) causada por mutações; alteração nas proteínas de membrana externa que reduzem a absorção do antibiótico; proteção da topoisomerase por proteínas Qnr que se ligam à topoisomerase protegendo-a da interação com as quinolonas e/ou através da acetilação do agente, realizada por enzimas codificadas em plasmídeos (Hasan & Al-Harmoosh, 2020). *Salmonella*, *Campylobacter*, *Neisseria* e *Shigella* são alguns dos géneros bacterianos que adquiriram resistência às quinolonas ao longo dos anos (Shrivastava *et al.*, 2018).

Sulfonamida e Trimetoprima: como referido anteriormente neste trabalho, as sulfonamidas inibem a síntese de ácido fólico competindo com o substrato natural, ácido p-aminobenzóico, pela enzima di-hidropteroato sintetase (Nogueira *et al.*, 2016). A trimetoprima, atua inibindo a enzima di-hidrofolato redutase (DHFR) bacteriana (Kappor *et al.*, 2017), enzima que catalisa a conversão do ácido di-hidrofólico em ácido tetra-hidrofólico (Nogueira *et al.*, 2016). A resistência das bactérias às sulfonamidas pode ser

mediada por mutações cromossômicas, que codificam a di-hidropteroato sintase (DHPS), ou em plasmídeo (Hasan & Al-Harmoosh, 2020; Sultan *et al.*, 2018). A superprodução de DHFR na célula bacteriana pode ser a causa da resistência à trimetoprima, sendo este o mecanismo mais comumente descrito entre as *Enterobacteriaceae* (Harris, 1964).

1.6. Microrganismos emergentes

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde deu a conhecer uma lista de microrganismos causadores de crescente preocupação, devido ao seu nível de resistência aos antibióticos. Esta lista foi realizada em colaboração com a Divisão de Doenças Infeciosas da Universidade de Tübingen, na Alemanha, de modo a promover a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (Davies, 2017). A lista da OMS está dividida em três níveis de prioridade (crítica, alta e média) de acordo com a necessidade que o seu controlo representa (Tabela 1) (Amezquita & Camargo, 2017).

A seleção dos agentes patogénicos seguiu uma lista de critérios, entre os quais: o nível de letalidade das infeções causadas pelo agente; a necessidade de internamento e o número de opções de tratamento existentes; a facilidade de disseminação do agente patogénico; a prevalência de resistência demonstrada e a sua tendência em dez anos; a carga bacteriana do agente em ambiente hospitalar e na comunidade; se as infeções causadas pelo microrganismo, podem ser prevenidas e se novos antibióticos para controlar essas mesmas infeções já estão a ser pesquisados e desenvolvidos (OPAN, 2017; Shrivastava *et al.*, 2018).

Os microrganismos descritos no nível de prioridade crítica podem ser encontrados no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) e são uma ameaça iminente à saúde humana. Através de mutações e da aquisição de elementos genéticos móveis, os agentes patogénicos ESKAPE desenvolveram mecanismos de resistência contra oxazolidinonas, macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, β -lactâmicos e antibióticos definidos como a última linha de defesa, incluindo carbapenémicos, glicopeptídeos e polimixinas (Oliveira *et al.*, 2020), tornando-se bactérias multirresistentes ou até mesmo *pandrug-resistant*, causadoras de infeções graves e geralmente mortais, como por exemplo, infeções da corrente sanguínea e pneumonias.

Tabela 1 - Lista de patógenos prioritários segundo a OMS (Adaptado: Shrivastava *et al.*, 2018).

Prioridade Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a carbapenêmicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a carbapenêmicos
	<i>Enterobacteriaceae</i> , resistente a carbapenêmicos, resistente a cefalosporinas de 3ª geração ou produtoras de ESBLs
Prioridade Alta	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente à vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária ou resistência à vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente à claritromicina
	<i>Campylobacter spp.</i> , resistente às fluoroquinolonas
	<i>Salmonella</i> , resistentes às fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a cefalosporina de 3ª geração, resistente às fluoroquinolonas.
Prioridade Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , sem sensibilidade à penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente à ampicilina
	<i>Shigella spp.</i> , resistente às fluoroquinolonas

Todas as bactérias mencionadas neste relatório, são alvo de exaustivos estudos epidemiológicos, como se poderá comprovar no decorrer deste documento.

2. Objetivos

A realização deste estágio teve como principal objetivo perceber a dinâmica associada à participação num estudo internacional de epidemiologia e qual a sua importância, numa altura em que se assiste, cada vez mais, ao aparecimento de infeções causadas por microrganismos emergentes, com evoluídos mecanismos de resistência antimicrobianos.

Como sub-objetivos era ambicionado o alcance de um maior conhecimento da rotina de um laboratório de microbiologia e dos métodos utilizados na colaboração com os estudos internacionais de epidemiologia.

Pretendia-se também, que no final deste estágio se compreendesse, de uma forma não só global, mas também local, a epidemiologia que afeta o Centro Hospitalar do Baixo Vouga e a região de Aveiro.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização da entidade de acolhimento

O Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV) é reconhecido por prestar cuidados de saúde com um elevado grau de qualidade e eficiência, bem como, pelo seu papel na investigação, inovação e desenvolvimento tecnológico e terapêutico (Repositório Comum, s.d.).

Este complexo hospitalar é dividido em três unidades (Hospital Infante D. Pedro em Aveiro; Hospital Distrital de Águeda e Hospital Visconde de Salreu em Estarreja), de forma a prestar cuidados de saúde diferenciados à população de, pelo menos, nove concelhos do distrito de Aveiro (Serviço Nacional de Saúde, 2021).

O estágio, neste documento relatado, foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica, do Hospital Infante D. Pedro (HIP) em Aveiro que engloba tantos outros serviços, como por exemplo, cardiologia, urologia, pneumologia, ortopedia, ginecologia e obstetrícia, infeciologia, nefrologia, gastroenterologia, medicina interna, cirurgia geral, medicina intensiva, urgência, entre outros (Centro Hospitalar do Baixo Vouga, s.d.-a)

O Serviço de Patologia Clínica apresenta como principal função a realização dos exames laboratoriais necessários ao diagnóstico e acompanhamento de doentes, e inclui todas as principais áreas funcionais de investigação clínico-laboratorial, entre elas, bioquímica, hematologia, imunologia/autoimunidade, biologia molecular e microbiologia (Centro Hospitalar do Baixo Vouga, s.d.-b).

O Laboratório de Microbiologia do HIP recebe, diariamente, diversos produtos biológicos como sangue, urina, fezes, expetoração, aspirado brônquico e endotraqueal, lavado bronco-alveolar, pús, entre outros, com o objetivo de realizar exames que permitam diagnosticar, facilitar o tratamento, monitorizar e prevenir doenças infecciosas.

3.2. Colheita de produtos biológicos

Os produtos biológicos podem ser colhidos pelo próprio doente, o que é possível no caso da colheita de urina ou fezes; por enfermeiros, principalmente quando se aplica a doentes internados; por técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica como é o caso da

colheita de sangue, ou por médicos, quer no decorrer das consultas, quer no bloco operatório (biopsias, líquido cefalorraquidiano, entre outros).

Após a colheita dos produtos biológicos necessários a uma determinada análise, estes devem ser transportados em recipientes estéreis próprios para o efeito, sendo que cada tipo de produto biológico é transportado em recipientes com características distintas, consoante as particularidades associadas à sua preservação.

As amostras são identificadas com os dados clínicos do paciente que incluem o seu nome e número de processo, tipo de produto biológico, data de colheita e um número de seis dígitos correspondente à própria amostra – número esse, importante para aceder ao programa informático do HIP – Appolo - onde se encontram os restantes dados clínicos do doente, tais como, idade, infeções anteriores, data de admissão em cada um dos serviços hospitalares, resultados clínicos, terapias subsequentes e outras informações.

Posteriormente à sua colheita e identificação, as amostras de todos os serviços são encaminhadas para o Serviço de Patologia Clínica onde serão analisadas.

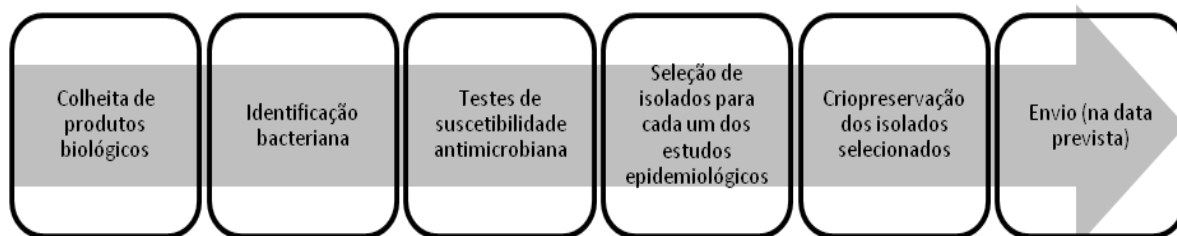


Figura 4 - Esquema do fluxo de trabalho incorporado no âmbito dos estudos epidemiológicos internacionais.

3.3. Identificação bacteriana

Aquando da receção das amostras na secção de Microbiologia, estas são inoculadas em diferentes meios de cultura – dependendo do tipo de produto biológico – e incubadas a 35-37°C por diferentes períodos de tempo.

As amostras correspondentes a infeções do trato respiratório, como expetoração, aspirado brônquico, aspirado endotraqueal e lavado bronco-alveolar, bem como amostras de pús podem ser inoculadas em Gelose MacConkey (BioMérieux, França), Gelose

Columbia (BioMérieux, França) com 5% de sangue de ovelha ou Gelose Chocolate PolyViteX (BioMérieux, França).

As amostras de sangue, após a indicação de hemocultura positiva pelo equipamento BD Batec, são inoculadas em Gelose Chocolate PolyViteX, que é um meio não seletivo e possui sangue de cavalo hemolisado na sua composição – permitindo o isolamento de bactérias fastidiosas.

Já as amostras de urina são geralmente inoculadas em Gelose CLED (BioMérieux, França), que devido ao teor em cistina e lactose e à sua deficiência electrolítica, permite o crescimento, diferenciação e inibição da mobilidade de bactérias Gram-negativas (atualmente, as principais responsáveis por infeções no trato urinário). A bacteriúria, observada após incubação, é classificada em não significativa quando a contagem é menor que 10^3 UFC/mL, duvidosa quando a contagem é de 10-100 UFC/mL ou significativa quando observamos 10^5 UFC/mL ou mais.

Após incubação, independentemente do tipo de produto biológico em análise, e se validadas para tal, as culturas positivas são identificadas por *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS).

A técnica MALDI-TOF MS (Figura 5) tem revolucionado a prática laboratorial clínica devido à sua simplicidade, rapidez de resposta e por ter uma maior precisão (com um menor volume de amostra) que os procedimentos laboratoriais clássicos. Nesta técnica, uma única colónia de células bacterianas, cultivadas em um meio sólido, é espalhada diretamente numa matriz que extrai proteínas por lise da parede celular. Continuamente e por exposição a um laser (geralmente ultravioleta), seguido de processos de dessorção e ionização, são formados iões de carga individual (Creative Proteomics, s.d.; Jang & Kim, 2018). A massa de cada ião é determinada a partir do tempo que este leva a percorrer a distância entre a matriz e o detector, tempo esse, medido por um analisador de tempo de voo. Por fim, a identificação microbiana é conseguida através da utilização de algoritmos de pontuação, que combinam e comparam espectros de espetrometria de massa, relativos a biomoléculas extraídas do microrganismo a identificar, com espectros de referência (Jang & Kim, 2018).

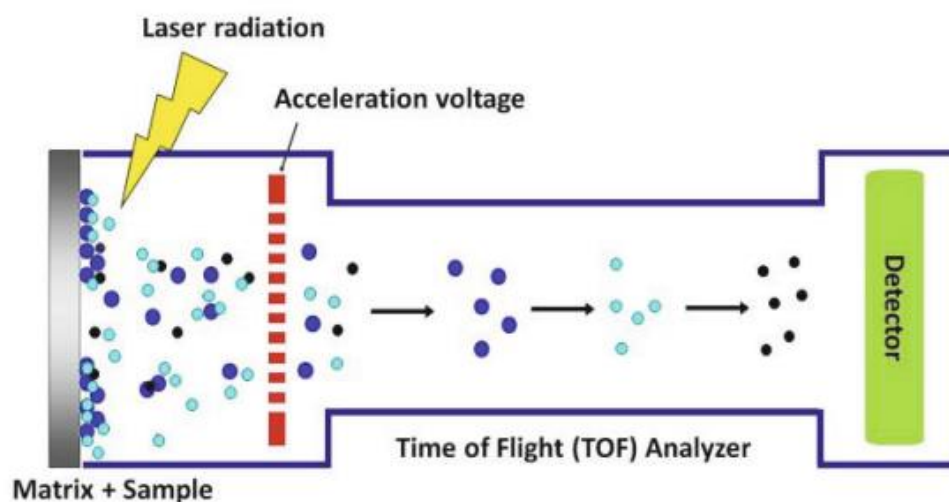


Figura 5 - Esquemática dos princípios da técnica de MALDI-TOF MS. Fonte: Jang & Kim, 2018.

3.4. Testes de susceptibilidade antimicrobiana

Identificada a bactéria, ou as bactérias, responsáveis pelo processo infeccioso, são realizados testes de susceptibilidade antimicrobiana, cujos resultados são obtidos semi-automaticamente - a partir de uma suspensão de 0,55-0,65 MacFarland obtida através de colónias provenientes de uma cultura pura - utilizando o sistema VITEK[®]2 (BioMérieux, França). De modo a avaliar o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias identificadas, este sistema automatizado utiliza cartas descartáveis, independentes e únicas para cada isolado, para as quais, a suspensão obtida é inoculada através de um sistema de vácuo. Cada uma das cartas utilizadas apresenta 64 poços, em que pelo menos um deles é utilizado como controlo positivo (não lhe é adicionado nenhum fármaco), os restantes poços são preenchidos com concentrações crescentes de vários antibióticos selecionados. Posteriormente à incubação das cartas, o crescimento microbiano é determinado por um leitor ótico através de medições de turbidez (Michalik, 2017). Os resultados obtidos são expressos em fenótipo sensível, intermédio ou resistente, a um antibiótico específico, de acordo com as diretrizes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Versão 12.0, janeiro 2022).

No entanto, quando é necessário aferir se determinadas bactérias têm a capacidade de expressar β -lactamases específicas, o sistema VITEK[®]2 não é o indicado, permitindo-nos apenas verificar a presença de ESBLs. Com esta finalidade e ainda, para descartar ou

confirmar resultados discordantes, são utilizados métodos manuais, como é o caso dos métodos de difusão (Método Kirby-Bauer e Teste Epsilon) e do método de diluição.

Para a realização de ambos os procedimentos de difusão, a Gelose Mueller-Hinton (BioMérieux, França) é o meio de referência, pois proporciona o crescimento e o estudo de microrganismos patogénicos exigentes e não exigentes de interesse clínico. O inóculo é preparado através da suspensão de algumas colónias, provenientes de uma cultura pura, numa solução de cloreto de sódio (NaCl) estéril até se obter a densidade ótica desejada – 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL, aproximadamente) – cuja medição é feita por um densitómetro. Depois de atingida a densidade ótica desejada, uma zaragatoa é mergulhada na suspensão e procede-se à inoculação do meio na sua totalidade, é importante deixar secar a gelose antes de aplicar os antibióticos.

O Método Kirby-Bauer, faz uso de discos de celulose impregnados com o fármaco, permitindo a classificação do microrganismo em estudo, perante os fármacos testados, como sensível, intermédio ou resistente. Os discos devem ser colocados afastados dos bordos da placa e distantes entre si, de modo a evitar a sobreposição de zonas de inibição. Após incubação, procede-se à medição do diâmetro dos halos de inibição seguindo as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Versão 10.0, janeiro 2022).

O Teste Epsilon (E-teste) consiste na utilização de tiras de plástico, não poroso, impregnadas com um gradiente crescente do fármaco, o que permite a determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

O método de diluição é utilizado para confirmar a indicação de resistência à colistina, por parte do sistema VITEK[®]2. Este método consiste na adição de uma suspensão bacteriana de densidade definida a um meio de cultura líquido, que será posteriormente dispensado numa placa contendo poços com concentrações crescentes de colistina liofilizada. Após um período de incubação (adequado a cada tipo de microrganismo), o desenvolvimento bacteriano é observado, permitindo classificar a bactéria como sensível ou resistente à colistina. A concentração mínima de antibiótico suficiente para inibir o desenvolvimento bacteriano é a concentração mínima inibitória.

3.5. Seleção de isolados

Os isolados integrantes dos estudos epidemiológicos em foco, são seleccionados entre todos os isolados obtidos através de culturas puras correspondentes à análise de produtos biológicos recebidos pela secção de Microbiologia do HIP. Esta seleção é feita de forma diária e durante o decorrer de todo o ano civil.

Diariamente são seleccionadas estirpes com base na sua identificação ou tipo de infeção pela qual são responsáveis, dependendo das exigências de cada um dos estudos epidemiológicos em foco.

O ATLAS requer a seleção de isolados com base na identificação do microrganismo, pois este estudo epidemiológico trabalha com microrganismos específicos. Já para os estudos SENTRY e SMART a seleção dos isolados é feita com base no tipo de infeção que os microrganismos identificados provocaram.

A quantidade de isolados recolhidos é variável e dependente da soma de estirpes de um mesmo microrganismo/tipo de infeção requeridas por cada estudo.

As exigências de cada estudo epidemiológico, face aos isolados e quantidade pretendida, estão detalhadas nos respectivos capítulos.

3.6. Criopreservação de estirpes

Seleccionados os isolados que irão integrar os estudos epidemiológicos internacionais com os quais o Serviço de Patologia Clínica do CHBV colabora, o passo seguinte é armazená-las até que se proceda ao seu envio.

De cada cultura pura correspondente a cada uma das estirpes seleccionadas, com uma ansa, retiram-se algumas colónias e colocam-se num tubo de criopreservação – contém glicerol e algumas esferas que permitem a fácil adsorção de microrganismos à sua superfície (Frilabo, s.d.) - tubo esse que deve ser devidamente identificado com o número correspondente à própria amostra, a identificação do microrganismo recolhido e os estudos epidemiológicos (e suas subcategorias) que irá integrar.

Seguidamente, os tubos são armazenados a -80°C até ao momento em que é necessário preparar as estirpes para posterior envio.

3.7. Preparação do envio

Dois dias antes da data de envio escolhida (de acordo com cronograma proporcionado por cada estudo), os tubos de criopreservação contendo estirpes de *Streptococcus* e *Haemophilus* são descongelados. As estirpes de *Streptococcus* são inoculadas em Gelose Columbia, enquanto as estirpes de *Haemophilus* são inoculadas em Gelose Chocolate PolyViteX – as placas resultantes são incubadas a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 48h numa atmosfera de CO_2 .

Faltando apenas um dia para o envio, todas as restantes estirpes são descongeladas e inoculadas em diversos meios de cultura consoante as características e exigências de crescimento de cada uma. A maioria das estirpes bacterianas é inoculada em Gelose Columbia ou Gelose Chocolate PolyViteX, à exceção das estirpes de *Proteus*, que devido à sua capacidade de *swarming* (rápida mobilidade) são inoculadas em Gelose CLED (cistina, lactose e deficiência electrolítica), visto que a deficiência electrolítica, característica deste meio, tem a capacidade de inibir a mobilidade deste género bacteriano. Já as estirpes de fungos são inoculadas em Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (BioMérieux, França), meio de cultura seletivo para leveduras e bolores. Estas estirpes são incubadas a $35-37^{\circ}\text{C}$ por um período de 24h.

De forma a minimizar o consumo de meios de cultura, volume de trabalho e espaço ocupado na estufa, cada gelose é virtualmente dividida em quatro partes iguais, podendo assim ser inoculada por quatro estirpes diferentes, sem que ocorra contaminação.

Após inoculação de todas as estirpes destinadas a envio, os tubos de criopreservação correspondentes são novamente armazenados a -80°C , possibilitando o reenvio de estirpes, se necessário. A necessidade de reenvio de um ou mais microrganismos pode surgir caso os mesmos não estejam viáveis aquando da sua chegada ou caso ocorra contaminação de uma ou mais amostras.

Completo o período de incubação, os microrganismos podem ser retirados das culturas frescas através de zaragatoas - componentes integrantes de um meio de transporte

de carvão. A presença de carvão ativado no meio favorece a recuperação de microrganismos, neutralizando as toxinas das bactérias, produzidas durante o transporte. Cada estudo epidemiológico fornece os seus próprios meios de transporte, sendo estes, muito semelhantes. Qualquer meio de transporte deve ser rotulado com etiquetas fornecidas pelo estudo que integra, etiquetas essas, preenchidas com o número associado a cada amostra - atribuído pelo HIP.

Todo este processo está descrito no manual de procedimentos dos estudos epidemiológicos abordados, como é possível observar no Anexo 1.

É importante, também ressaltar que uma mesma estirpe pode integrar dois, ou até três dos estudos epidemiológicos, deste modo, a sua inoculação é idealizada para suprir a necessidade da recolha por duas/três zangãos diferentes.

Nesta altura, os formulários que acompanham cada estirpe devem estar já preenchidos. Cada estudo epidemiológico fornece um modelo de formulário distinto, onde são preenchidos diversos campos de informação, sem nunca ser revelada a identidade do utente. Os estudos ATLAS e SMART fornecem formulários de folha duplicada destinados a preenchimento manual. Antes do envio, a folha duplicada de cada formulário deve ser separada, sendo que a original é enviada em conjunto com as estirpes, a cópia (folha amarela) fica armazenada no HIP. Já os formulários do SENTRY são disponibilizados em formato digital (Microsoft Office Excel) e após o seu preenchimento, são impressos e enviados juntamente com as estirpes integradas neste estudo.

As particularidades do modelo de formulário de cada estudo irão ser abordadas nos respectivos capítulos.

4. Capítulo I - *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*

4.1. Contextualização do estudo epidemiológico

Instituído pela Merck em 2002 e conduzido pelo *International Health Management Associates* (IHMA), o SMART é um dos maiores e mais antigos estudos internacionais de vigilância da resistência antimicrobiana ainda em funcionamento (Merck & Co., 2020).



Figura 6 - Logótipo do *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*.

A Merck é uma empresa biofarmacêutica e química fundada por George Merck em 1891, nos Estados Unidos. Em 1899, a empresa publicou o primeiro Manual Merck – um livro de consulta para médicos e farmacêuticos - passando este a ser uma das referências médicas mais utilizadas, servindo atualmente, tanto os profissionais de saúde como o público em geral (Manual MSD, s.d.). No entanto, só em 1933 é que se assistiu à criação de um laboratório de pesquisa farmacológica (Merck, s.d.).

Até aos dias de hoje, foram muitos os contributos desta empresa para o tratamento de diversas doenças infecciosas em humanos, incluindo a criação da primeira vacina contra a pneumonia (1977), desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a hepatite B (1986), produção de sulfato de indinavir, utilizado no tratamento do vírus da imunodeficiência humana (1996), criação de uma vacina quadrivalente contra o vírus do papiloma humano (2006), bem como o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus ébola (2019), entre outros (Merck, s.d.).

A formação do SMART vem em conformidade com o compromisso contínuo de vigilância da resistência antimicrobiana, adotado pela Merck, e em 2002 contou com a colaboração de 40 participantes.

O *International Health Management Associates*, fundado por Jack Johnson em 1992, caracteriza-se pela liderança em estudos de vigilância e ensaios clínicos. Contando com laboratórios nos Estados Unidos e na Europa, é considerado mundialmente, como o principal fornecedor de suporte ao desenvolvimento de antimicrobianos. A sua parceria com indústrias de biotecnologia, farmacêutica e diagnóstico, garante o sucesso no desenvolvimento de diversos medicamentos, bem como a sua comercialização (*International Health Management Associates, s.d.*).

A monitorização longitudinal dos padrões de resistência antimicrobiana é fundamental para adaptar e atualizar os nossos conhecimentos atuais, permitindo o desenvolvimento de novas e melhoradas terapias, consoante a evolução dos mecanismos de resistência dos microrganismos em estudo (*AMR Industry Alliance, 2017*). Com este propósito e desde 2002, o SMART convidava cada um dos seus participantes a colher 100 isolados de bacilos Gram-negativos a partir de infeções intra-abdominais, adquiridas quer na comunidade quer em meio hospitalar. Em 2009, a monitorização destes isolados foi estendida, também, a infeções do trato urinário. Posteriormente, a susceptibilidade ou resistência dos isolados recolhidos, face a 14 antibióticos comumente utilizados, era determinada, de modo a esclarecer as tendências de mudança no padrão de susceptibilidade dos microrganismos (*Morrissey et al., 2013*).

Com o avançar do tempo, este estudo epidemiológico foi evoluindo e obtendo cada vez mais notoriedade, credibilidade e resultados, fazendo com que, ano após ano, mais participantes se quisessem associar ao programa. Em 2011 passou a reunir 179 participantes repartidos por 51 países (*Morrissey et al., 2013*) e em 2017 dispôs de 192 participantes de 54 países, integrando todas as regiões do mundo (*AMR Industry Alliance, 2017*).

Atualmente, e à data de realização deste estágio, o programa conta com 217 colaboradores distribuídos por mais de 60 países e objetivos ligeiramente diferentes dos abordados anteriormente.

4.2. Objetivos

À semelhança do que era pretendido em 2021, em 2022, o SMART pretende monitorizar, internacionalmente, a suscetibilidade de microrganismos Gram-negativos, clinicamente relevantes, ao ertapenemo, Zerbaxa e a outros antimicrobianos (Merck & Company, 2022). Para atingir este objetivo é solicitada, a cada um dos participantes do programa, a colheita de isolados clínicos recentes deste tipo de microrganismos, provenientes de pacientes diagnosticados com infeção intra-abdominal, infeção do trato urinário, infeção da corrente sanguínea ou infeção do trato respiratório inferior, infeções estas, adquiridas na comunidade ou em meio hospitalar (Merck & Company, 2022). Para além desta intenção, o estudo epidemiológico da Merck, ambiciona monitorizar longitudinalmente os padrões de susceptibilidade (com base na concentração mínima inibitória) dos isolados recolhidos, de modo a ser capaz de identificar mudanças precoces nestes padrões – para isso, os colaboradores são incentivados a participar anualmente - e ainda, poder caracterizar molecularmente isolados bacterianos resistentes para melhor compreender os seus mecanismos de resistência (Merck & Co., 2021).

4.2.1. Zerbaxa

Zerbaxa é o nome comercial da combinação de duas substâncias ativas - ceftolozano, uma cefalosporina de quinta geração, com o inibidor de β -lactamases, tazobactam (Merck Sharp & Dohme Corp, 2020). Este antibiótico é administrado por profissionais de saúde por via intravenosa e consiste no uso de 1147 mg/frasco de sulfato de ceftolozano (equivalente a 1g de ceftolozano) e 537 mg/frasco de tazobactam sódico (equivalente a 0,5g de tazobactam), ácido cítrico, L-arginina e cloreto de sódio (Merck Sharp & Dohme Corp, 2020).

O ceftolozano ($C_{23}H_{31}N_{12}O_8S_2^+ \cdot HSO_4^-$) é um derivado da ceftazidima – uma cefalosporina de terceira geração - no entanto, através da presença, na sua estrutura química, de uma cadeia lateral modificada, apresenta uma maior potência bactericida que esta (Koulenti *et al.*, 2019; Merck Sharp & Dohme Corp, 2020). A sua eficácia resulta da inibição da síntese de parede celular, mediada pela ligação às PBPs, mas pode ser limitada pela produção de β -lactamases por parte dos microrganismos aos quais se destina (Merck Sharp & Dohme Corp, 2020).

O tazobactam (C₁₀H₁₁N₄NaO₅S) é um inibidor irreversível de penicilinas e cefalosporinas, podendo ainda, ligar-se covalentemente a outras β-lactamases cuja expressão é mediada por cromossomas ou pela aquisição de plasmídeos (Merck Sharp & Dohme Corp, 2020).

A combinação destas duas substâncias demonstrou atividade considerável contra bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e de β-lactamases dos grupos TEM, CTX-M, SHV e OXA, no entanto não é ativa contra bactérias produtoras de carbapenemases serínicas e metalo-β-lactamases (Merck Sharp & Dohme Corp, 2020; Rusu & Lungu, 2020). Esta formulação apresenta, ainda, atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* capazes de expressar AmpC cromossómica, e contra certas bactérias anaeróbicas (Rusu & Lungu, 2020).

Tabela 2 - Microrganismos suscetíveis ao Zerbaxa por cada tipo de infeção, tanto *in vitro*, como em contexto de infeção clínica (Merck Sharp & Dohme Corp, 2020; Rusu & Lungu, 2020).

Infeções intra-abdominais complicadas	Bactérias Gram-negativas Aeróbias e facultativas	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Bactérias Gram-positivas Aeróbias e facultativas	<i>Streptococcus anginosus</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Streptococcus salivarius</i>
	Bactérias anaeróbias	<i>Bacteroides fragilis</i>
Infeções do trato urinário complicadas	Bactérias Gram-negativas Aeróbias e facultativas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pneumonia nosocomial	Bactérias Gram-negativas Aeróbias e facultativas	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>

Aprovado em 2014 pela FDA e em 2015 pela EMA, Zerbaxa foi indicado para o tratamento de utentes com mais de 17 anos de idade que apresentem infeções intra-abdominais ou do trato urinário complicadas, incluindo pielonefrite. Mais recentemente,

em 2019, a FDA aprovou a sua utilização, também no tratamento de pneumonia nosocomial, incluindo pneumonia associada à ventilação mecânica (Tabela 2) (Giaccari *et al.*, 2021; Rusu & Lungu, 2020).

Apenas comprovado *in vitro*, sem significado clínico conhecido, Zerbaxa demonstrou ter a capacidade de combater diversas outras bactérias, na ausência de mecanismos de resistência adquiridos, tais como, *Citrobacter koseri*, *Moraxella catarrhalis*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella aerogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (Merck Sharp & Dohme Corp, 2020).

4.2.2. Ertapenemo

Ertapenemo (C₂₂H₂₅N₃O₇S) é um 1-β-metilcarbapenem sintético comercializado pela Merck sob o nome Invanz. Este antibiótico pode ser administrado por via intravenosa ou intramuscular e consiste no uso de 1,046g de ertapenemo sódico, equivalente a 1g de ertapenemo, bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio (Merck Sharp & Dohme Corp., 2022)

A atividade bactericida do ertapenemo, à semelhança do ceftolozano, resulta da inibição da síntese da parede celular, inibição essa, mediada pela ligação do ertapenem às PBPs (Merck Sharp & Dohme Corp., 2022). No entanto, e contrariamente à substância ativa referida anteriormente, o ertapenemo é por si só, consideravelmente resistente à ação da maioria das β-lactamases, incluindo penicilinases, cefalosporinas e ESBLs, mas não à hidrólise provocada pela expressão de metalo-β-lactamases (Merck Sharp & Dohme Corp., 2022).

Aprovado, em 2001, pela FDA, e em 2002, pela EMA, Invanz é indicado para o tratamento de utentes com mais de três meses de idade que apresentem infeções intra-abdominais complicadas, pneumonia adquirida na comunidade, infeções pélvicas agudas, infeções complicadas de pele e tecidos moles (incluindo pé diabético), infeções do trato urinário e septicemia bacteriana, consideradas moderadas a graves e causadas por microrganismos certamente ou muito provavelmente susceptíveis ao ertapenemo (Tabela 3) (EMA, 2022; Merck Sharp & Dohme Corp., 2022).

Apesar do grande alcance deste antibiótico, o mesmo não apresenta atividade contra várias outras bactérias clinicamente relevantes, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (Goldstein *et al.*, 2002; Livermore *et al.*, 2001).

Tabela 3 - Microrganismos suscetíveis ao Invanz por cada tipo de infecção, tanto *in vitro*, como em contexto de infecção clínica (EMA, 2022; Merck Sharp & Dohme Corp., 2022).

Infeções intra-abdominais complicadas	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Escherichia coli</i>
	Bactérias anaeróbias	<i>Clostridium clostridioforme</i> <i>Eubacterium lentum</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides distasonis</i> <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides uniformis</i>
Infeções complicadas de pele e tecidos moles	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i>
	Bactérias Gram-positivas Aeróbias ou facultativas	<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à meticilina <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
	Bactérias anaeróbias	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> <i>Prevotella bivia</i>
Infeções pélvicas agudas	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Escherichia coli</i>
	Bactérias Gram-positivas Aeróbias ou facultativas	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	Bactérias anaeróbias	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> <i>Prevotella bivia</i>
Pneumonia adquirida na comunidade	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Haemophilus influenzae</i> β -lactamase negativos <i>Moraxella catarrhalis</i>
	Bactérias Gram-positivas Aeróbias ou facultativas	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sensíveis à penicilina
Infeções do trato urinário	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Para além dos microrganismos apresentados na tabela 3, também os seguintes, são suscetíveis à atividade do ertapenemo, tanto *in vitro* como em infecções clínicas: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*,

Haemophilus parainfluenzae, Klebsiella oxytoca, Morganella morganii, Proteus vulgaris, Providencia rettgeri, Providencia stuartii e Serratia marcescens.

4.3. Materiais fornecidos

No início de qualquer ano civil o IHMA envia, a cada um dos participantes, todos os materiais indispensáveis à compreensão e realização dos procedimentos, que os mesmos, necessitam de realizar de forma a colaborar com este estudo epidemiológico.

Estes materiais incluem um dossiê onde se pode encontrar uma breve revisão literária sobre os motivos que levam a realização deste estudo epidemiológico a ser tão importante e necessário, bem como os objetivos definidos, pelo programa, para esse ano. Ainda integrado neste dossiê encontramos um manual de procedimentos, os objetivos e critérios de seleção que cada participante deve cumprir, bem como um cronograma e todos os documentos necessários ao envio dos isolados (*Federal Express air waybill, Shipping Notification Form, Commercial Invoice Template*).

Para além do dossiê, os laboratórios de microbiologia participantes recebem 260 *Organism Report Forms*, 260 tubos de transporte (zaragatoas), 260 tubos de glicerol destinados ao armazenamento dos isolados, 15 sacos de transporte de isolados, três caixas de cartão para o envio dos isolados, entre outros materiais.

4.4. Seleção de isolados

Cada participante integrado no SMART tem como objetivo, a recolha, identificação, armazenamento e envio de um total de 250 isolados clínicos frescos consecutivos, distribuídos da seguinte forma: 50 isolados provenientes de infeções intra-abdominais, 50 isolados provenientes de infeções do trato urinário, 100 isolados provenientes de infeções do trato respiratório inferior e 50 isolados provenientes de infeções da corrente sanguínea (Merck & Company, 2022).

4.4.1. Critérios de inclusão

Os isolados integrantes do SMART devem ser recolhidos e armazenados entre 1 de janeiro e 31 de dezembro do respetivo ano civil, devem ainda, ter relevância clínica, ou seja, cada isolado tem de ser considerado o provável agente causador da infeção em

análise. Vários organismos de uma amostra são aceitáveis, desde que cada um seja um bacilo Gram-negativo inicial único (Merck & Company, 2022). Apenas o primeiro isolado de uma espécie particular por paciente para todo o período de colheita é aceitável. Mais especificamente, cada tipo de infecção possui os seus próprios critérios de inclusão:

Infeções intra-abdominais: bactérias Gram-negativas aeróbias ou facultativas obtidas através de produtos biológicos de origem intra-abdominal (apêndice, peritoneu, cólon, bÍlis, pÉlvis e pâncreas). Amostras obtidas através de paracentese também são aceites.

Infeções do trato urinário: bactérias Gram-negativas aeróbias ou facultativas obtidas através de produtos biológicos recolhidos do trato urinário (uréter, uretra, bexiga ou urina).

Infeções da corrente sanguínea: bactérias Gram-negativas aeróbias ou facultativas obtidas através de hemoculturas.

Infeções do trato respiratório inferior: bactérias Gram-negativas aeróbias ou facultativas obtidas através de produtos biológicos recolhidos do trato respiratório inferior (lavado bronco-alveolar, escovado brônquico, aspirado endotraqueal, biopsia pulmonar e expetoração). Amostras obtidas por toracocentese também são aceites. Amostras de expetoração têm de respeitar os parâmetros de qualidade convencionais – ter menos de dez células epiteliais pavimentosas e mais de 25 neutrófilos por campo no microscópio ótico (objetiva 10x).

4.4.2. Critérios de exclusão

- Isolados considerados contaminantes.
- Isolados de fezes, abcesso perirretal ou drenos *in situ*
- Bactérias dos géneros *Haemophilus* ou *Moraxella* ou isolados pertencentes a grupos bacterianos diferente dos definidos pelo protocolo.
- Isolados obtidos através de amostras ambientais ou de culturas de vigilância destinadas para fins de controlo de infeção.
- Isolados duplicados (mesmo género e espécie) obtidos através do mesmo paciente, independentemente de terem sido recolhidos do mesmo ou de locais diferentes do corpo, do padrão de suscetibilidade antimicrobiana ou do perfil fenotípico.

4.5. *Requisition Forms*

Cada um dos isolados integrantes do estudo epidemiológico deve ser acompanhado de um formulário (*Requisition Form*) destinado ao preenchimento de informações demográficas. Neste formulário são preenchidos diversos campos de informação, tais como, o sexo e idade do utente, o tipo de produto biológico a partir do qual foi identificado o microrganismo e a sua data de colheita, o serviço no qual o utente se encontra e a sua data de admissão, o tipo de microrganismo recolhido e o número identificativo da amostra no laboratório local. Estes formulários têm ainda uma etiqueta numerada com o mesmo número do formulário a que pertence, que posteriormente é utilizada para identificar o tubo de transporte, esta etiqueta deve ser preenchida com o número identificativo da amostra e um número codificador do microrganismo em causa (disponibilizado no próprio formulário), como exemplificado no Anexo 2.

Os *Requisition Forms* (RQ) são formulários OptiScan™ desenvolvidos pelo IHMA de modo a que a sua leitura seja possível com recurso a um rápido reconhecimento ótico de caracteres (Merck & Company, 2022). Como este reconhecimento é realizado por um computador, e não por um humano, é importante que os dados estejam exatamente na mesma localização física em todos os formulários para que sejam lidos com precisão. Por este motivo, e por cada formulário incorporar informações codificadas, que devem permanecer exclusivas, o uso de fotocópias é proibido. Cada formulário é numerado de forma individual (“IHMA Number” – número usado pelo IHMA como referência interna para cada isolado) e deve ser usado apenas uma única vez.

Estruturalmente, os RQ são formulário de folha duplicada destinados a preenchimento manual, aquando do envio dos isolados recolhidos, a folha original (branca) de cada formulário, é enviada em conjunto com o seu respetivo isolado, enquanto a cópia (folha amarela) fica armazenada no laboratório de microbiologia dos participantes.

Embora o reconhecimento ótico de caracteres seja muito eficiente, o sucesso e a precisão do processo são aprimorados pelo seguimento de algumas regras básicas:

- Escrita de números e letras (quando necessário) legíveis e dentro dos espaços a elas destinados.

- Preenchimento total dos círculos de resposta, o seu preenchimento com cruces ou certos não é válido.
- Apenas é permitida a utilização de canetas esferográficas para o preenchimento dos formulários, a utilização de lápis ou marcadores não é válida.
- Caso ocorra um erro no preenchimento de um formulário, este deve ser descartado, sendo as informações demográficas referentes ao isolado em causa, descritas no formulário seguinte.

4.6. Envio

O SMART, como já referido, apresenta um cronograma de envio, que contempla três envios separados. Este cronograma deve ser seguido pois ajudará a garantir a viabilidade máxima dos isolados submetidos. No protocolo de 2022, os envios estão programados da seguinte forma (Merck & Company, 2022):

- Primeiro envio: de 1 a 30 de abril de 2022
- Segundo envio: de 1 a 31 de outubro de 2022
- Terceiro envio: de 1 a 31 de janeiro de 2023

É importante relembrar que segundo os critérios de inclusão, os isolados submetidos neste último envio devem ter sido colhidos e armazenados até 31 de dezembro de 2022.

Os isolados recolhidos por cada laboratório participante são enviados para o Laboratório Central do IHMA, preferencialmente pela transportadora *Federal Express* (FedEx) que possui regulamentos de transporte internacionais de substâncias biológicas (categoria B). As informações necessárias ao preenchimento do conhecimento de embarque aéreo (*air waybill*), como o endereço de envio, informações biológicas, peso e dimensões estão já pré-inseridas neste documento. No entanto, em envios internacionais é requerida a assinatura do conhecimento de embarque aéreo e provisão da fatura comercial (*Commercial Invoice*).

5. Capítulo II - *Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance*

5.1. Contextualização do estudo epidemiológico

Patrocinado pela Pfizer e conduzido pelo IHMA, surgiu em 2004, o ATLAS que representa, atualmente, a agregação de três programas de vigilância de resistência antimicrobiana, sendo estes, o *International Network for Optimal Resistance Monitoring* (INFORM), *Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance and Evaluation* (AWARE) e o *Tigecycline Evaluation Surveillance Trial* (TEST) (Dowzicky, 2019).



Figura 7 - Logótipo do *Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance*.

A Pfizer foi fundada em 1849 por Charles Pfizer e Charles Erhart em Brooklyn, Nova Iorque e menos de um século depois, graças à tecnologia de fermentação, é a mais bem-sucedida empresa no que toca à produção em massa de penicilina (Pfizer, s.d.). Foram inúmeros os contributos farmacológicos da Pfizer no combate às doenças infecciosas, entre os quais são destacados os seguintes (Pfizer, s.d.):

- Em 1950, a empresa vê o seu primeiro antibiótico aprovado pela FDA, o Terramycin (oxitetraciclina).
- É lançado o primeiro antibiótico de amplo espectro de uso diário, o Vibramycin (doxiciclina hiclato), em 1967.
- Em 1986, a Pfizer apresenta o Unasyn (ampicilina sulbactam), um antibiótico injetável.

- Em 1992, assistiu-se ao lançamento do Zithromax (azitromicina) destinados ao tratamento de infecções respiratórias e da pele.
- Após uma década sem desenvolvimentos, em 2007, a empresa lança os comprimidos Selzentry (maraviroc), os primeiros de uma nova classe de medicamentos orais contra o vírus da imunodeficiência humana.

Atualmente, a farmacêutica conta com um total de 49 fábricas e mais de 88 mil colaboradores distribuídos por mais de 125 países em todo o mundo. A Pfizer Portugal soma, até à data, 65 anos (Pfizer Portugal, s.d.).

O ATLAS é um dos maiores programas de vigilância da resistência antimicrobiana no mundo, apresenta como compromisso contínuo, fornecer recursos significativos que possam garantir a utilização adequada de antibióticos e melhorar a prevenção e o controlo de infeções (AMR Industry Alliance, s.d.).

À data da sua fundação, o objetivo deste estudo epidemiológico era o de compreender as mudanças em tempo real e analisar tendências atuais de resistência bacteriana global ou regional (AMR Industry Alliance, s.d.).

Atualmente, o programa conta com a colaboração de, aproximadamente, 226 participantes distribuídos por mais de 70 países e uma base de dados, com informações referentes a mais de 500 mil isolados (Pfizer, 2017). Esta base de dados é atualizada a cada seis ou 12 meses, sendo o seu acesso gratuito a profissionais de saúde ou investigadores para que estes possam ser informados sobre as tendências de resistência no seu país e no mundo, bem como apoiar as autoridades de saúde globais no desenvolvimento de Programas de Gestão Antimicrobiana (AMR Research Initiative, s.d.).

5.2. Objetivos

À semelhança do que era pretendido em 2021, em 2022, o ATLAS pretende avaliar a atividade longitudinal *in vitro* da tigeciclina, linezolid, ceftarolina, ceftarolina-avibactam, ceftazidima-avibactam e outros novos compostos da Pfizer, contra isolados de relevância clínica, recolhidos de pacientes hospitalizados com infeções intra-abdominais, infeções do trato urinário, infeções do trato respiratório inferior, infeções da corrente sanguínea ou infeções de pele e tecidos moles (Pfizer Inc., 2021).

5.2.1. Tigeciclina

A tigeciclina ($C_{29}H_{39}N_5O_8$) foi inicialmente comercializada pela empresa farmacêutica Wyeth sob o nome Tygacil, medicamento de administração intravenosa, aprovado pela *FDA* em 2005 e pela *EMA* em 2006, para o tratamento de infecções complicadas da pele e tecidos moles. Em 2009, passou a ser comercializado pela multinacional Pfizer, desde que esta comprou a farmacêutica Wyeth, e o seu uso passou também, a ser aprovado no tratamento de pneumonias adquiridas na comunidade (Drugs.com, s.d.).

Derivada das tetraciclinas, a tigeciclina é o primeiro membro da classe de antibióticos glicilciclina a ser comercializado, com atividade documentada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Rose *et al.*, 2006; Sader *et al.*, 2005).

Considerado um antibiótico bacteriostático, a eficiência da tigeciclina prende-se com a sua capacidade em inibir o processo de tradução proteica das bactérias. Este antimicrobiano liga-se, reversivelmente, à subunidade ribossomal 30s, bloqueando a entrada do complexo aminoacil-tRNA no sítio A do ribossoma, deste modo, a incorporação de aminoácidos em cadeias peptídicas é evitada (Rose *et al.*, 2006).

Atualmente, Tygacil é indicado para o tratamento de utentes com mais de 17 anos de idade que apresentem infecções complicadas da pele e tecidos moles (à exceção de infecções de pé diabético), pneumonia bacteriana adquirida na comunidade ou infecções intra-abdominais complicadas (Tabela 4) (Peterson, 2008), infecções essas, causadas por isolados certamente ou fortemente suspeitos de serem suscetíveis a este antibiótico (Wyeth Pharmaceuticals, 2021).

Após relatos de uma maior taxa de mortalidade e reduzida eficácia, Tygacil não é apontado para o tratamento de pneumonia adquirida em meio hospitalar ou associada a ventilação mecânica (Wyeth Pharmaceuticals, 2021).

In vitro e sem significado clínico conhecido, este antibiótico demonstrou ter a capacidade de combater, na ausência de mecanismos de resistência adquiridos, diversas bactérias Gram-negativas, tais como, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Haemophilus influenzae* (resistentes à

ampicilina), *Haemophilus parainfluenzae*, *Pasteurella multocida*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* e variadas bactérias Gram-positivas, como é o caso das estirpes de *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecalis* (resistentes à vancomicina), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* (Wyeth Pharmaceuticals, 2021).

Tabela 4 - Microrganismos suscetíveis ao Tygacil por cada tipo de infecção, tanto *in vitro*, como em contexto de infecção clínica (Peterson, 2008; Wyeth Pharmaceuticals, 2021).

Infeções intra-abdominais complicadas	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Bactérias Gram-positivas Aeróbias ou facultativas	<i>Enterococcus faecalis</i> sensíveis à vancomicina <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus anginosus</i>
	Bactérias anaeróbias	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides uniformis</i> <i>Bacteroides vulgatus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Peptostreptococcus micros</i>
Pneumonia adquirida na comunidade	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Haemophilus influenza</i> <i>Legionella pneumophila</i>
	Bactérias Gram-positivas Aeróbias ou facultativas	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sensíveis à penicilina
Infeções complicadas da pele e tecidos moles	Bactérias Gram-negativas Aeróbias ou facultativas	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Bactérias Gram-positivas Aeróbias ou facultativas	<i>Enterococcus faecalis</i> sensíveis à vancomicina <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
	Bactérias anaeróbias	<i>Bacteroides fragilis</i>

5.2.2. Linezolida

A linezolida (C₁₆H₂₀FN₃O₄) é considerada o primeiro membro da classe de antibióticos oxazolidinonas (Hashemian *et al.*, 2018), tendo o seu uso sido aprovado, pela FDA em 2000 e pela EMA em 2001, registado sob o nome Zyvox através da *Pharmacia &*

Upjohn Company, membro agora integrante da farmacêutica Pfizer, desde 2003 (Pharmacia & Upjohn Company, 2014; Pfizer, 2003).

À semelhança da tigeciclina, este antimicrobiano sintético impede a síntese de proteínas bacterianas. Estabelecendo ligações ao 23S rRNA da subunidade ribossomais 50s, a linezolida impede a formação do complexo de iniciação funcional 70s (Hashemian *et al.*, 2018; Pfizer, 2003), o que resulta numa redução do comprimento das cadeias peptídicas já estabelecidas e na diminuição da capacidade de tradução por parte da célula bacteriana (Hashemian *et al.*, 2018). Ao inibir a síntese proteica, a linezolida, impede também, a expressão de diversos fatores de virulência e leva à diminuição da produção de toxinas por parte dos microrganismos suscetíveis (Hashemian *et al.*, 2018).

Podendo ser administrado por via intravenosa ou via oral, o Zyvox é indicado no tratamento de adultos e crianças, que apresentem pneumonia adquirida na comunidade ou em meio hospitalar ou infeções da pele e tecidos moles (incluindo infeções do pé diabético, sem osteomielite concomitante), desde que causadas por bactérias Gram-positivas, certamente ou fortemente suspeitas de serem suscetíveis à linezolida (Tabela 5). Para além destes tipos de infeções, Zyvox é também indicado no tratamento de infeções causadas por *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (Pharmacia & Upjohn Company, 2014).

Zyvox demonstrou tanto *in vitro* como no combate de infeções clínicas, exibir atividade bacteriostática contra *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina e *Staphylococcus aureus*, no entanto, na presença da maioria dos isolados de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, este antimicrobiano exibe atividade bactericida (Pharmacia & Upjohn Company, 2014).

Apenas comprovado *in vitro*, este fármaco, demonstrou ter a capacidade de combater diversas outras bactérias Gram-positivas, tais como, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* sensíveis à vancomicina, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, e ainda uma espécie bacteriana Gram-negativa, a *Pasteurella multocida* (Pharmacia & Upjohn Company, 2014).

Tabela 5 - Microrganismos suscetíveis ao Zyvox por cada tipo de infecção, tanto *in vitro*, como em contexto de infecção clínica (Pharmacia & Upjohn Company, 2014).

Pneumonia adquirida na comunidade	Bactérias Gram-positivas Aeróbias e facultativas	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à metilina
Pneumonia nosocomial		<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Infeções da pele e tecidos moles (complicadas)		<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>
Infeções da pele e tecidos moles (não complicadas)		<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à metilina <i>Streptococcus pyogenes</i>

5.2.3. Ceftarolina

A ceftarolina (C₂₂H₂₁N₈O₈PS₄), é comercializada pela farmacêutica Pfizer sob o nome Zinforo. Aprovado pela FDA em 2010 e pela EMA em 2012, este antibiótico, administrado por via intravenosa, consiste no uso de 600 mg/frasco de ceftarolina fosamila (equivalente a 530 mg de ceftarolina) e arginina (Kaushik *et al.*, 2011; Laudano, 2011; Wyeth Pharmaceuticals, 2022).

Derivada do cefozopran, uma cefalosporina de quarta geração, e desenvolvida através de diversas modificações estruturais, a ceftarolina fosamil, apresenta uma maior solubilidade em água, sendo rapidamente convertida no agente bioativo ceftarolina, quando chega ao plasma (Laudano, 2011). O efeito bactericida da ceftarolina passa por estabelecer uma ligação às PBPs, inibindo a síntese de peptidoglicano, o que por sua vez, resulta na morte da célula bacteriana (Kaushik *et al.*, 2011). As espécies de *Staphylococcus aureus* têm quatro PBPs naturais, sendo que a ceftarolina apresenta afinidade para todas elas, é por este motivo que apresenta efeito sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (Kaushik *et al.*, 2011).

Não estando estabelecida a sua eficácia no combate de infecções clínicas, a ceftarolina apresenta ainda, *in vitro*, atividade contra espécies de *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* (European Medicines Agency, 2021).

Tabela 6 - Microrganismos suscetíveis ao Zinforo por cada tipo de infecção, tanto *in vitro*, como em contexto de infecção clínica (European Medicines Agency, 2021; Wyeth Pharmaceuticals, 2022).

Infeções complicadas da pele e tecidos moles	Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Morganella morganii</i>
	Bactérias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> (incluindo estirpes resistentes à meticilina) <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
Pneumonia adquirida na comunidade	Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenza</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Bactérias Gram-positivas	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (apenas estirpes suscetíveis à meticilina)

5.2.4. Ceftarolina/Avibactam

Apesar de indicada para o tratamento de infeções causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como relatado anteriormente, a ceftarolina não tem atividade contra estirpes de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, serina carbapenemases e algumas metalo- β -lactamases (Wyeth Pharmaceuticals, 2022).

O avibactam tem uma atividade antibacteriana muito limitada, no entanto consegue inibir uma variedade de β -lactamases, como é o caso das β -lactamases de classe A (ESBLs e KPC por exemplo), C (AmpC) e D (OXA), na classificação de Ambler (Castanheira et al., 2008; Sader *et al.*, 2013).

Devido à sua capacidade de inibir a hidrólise do anel β -lactâmico da ceftarolina, a sua adição permite a atividade desta cefalosporina, contra *Enterobacteriaceae* resistentes a antibióticos β -lactâmicos, desde que essa resistência se deva à produção de β -lactamases, expandindo significativamente o espectro de atividade da ceftarolina (Bhalodi *et al.*, 2014; Castanheira *et al.*, 2008; Sader *et al.*, 2013).

Esta combinação (ceftarolina-avibactam) é conhecida como CXL e era um dos ativos em desenvolvimento do negócio anti-infeccioso de pequenas moléculas da AstraZeneca, no entanto, desde 2016 (Pfizer, 2016), a Pfizer adquiriu os direitos de desenvolvimento e

comercialização globais (à exceção da América do Norte) deste ativo, bem como do, já aprovado, medicamento Zavicefta (ceftazidima-avibactam), que será abordado de seguida.

5.2.5. Ceftazidima/Avibactam

A ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração que, como outros antimicrobianos β -lactâmicos, exerce o seu efeito bactericida ligando-se às PBPs, levando à lise e morte celular bacteriana (European Medicines Agency, 2022; Shirley & Shirley, 2018; Zhanel *et al.*, 2013). No entanto, tal como a ceftarolina, vê a sua atividade limitada no combate de bactérias produtoras de β -lactamases. Para combater esta limitação e aumentar o seu espectro de ação, esta cefalosporina é, também ela, combinada com o inibidor de β -lactamase, avibactam.

Aprovada pela EMA em 2016, a associação ceftazidima-avibactam, é comercializada globalmente, sob o nome Zavicefta, pela Pfizer, que, como referido anteriormente, adquiriu os seus direitos de desenvolvimento e comercialização, em 2016, à exceção da América do Norte, onde este fármaco é comercializado sob o nome Avycaz pela farmacêutica Allergan (Pfizer, 2016), tendo sido aprovada pela FDA em 2015.

Zavicefta é um medicamento de administração intravenosa constituído por ceftazidima penta-hidratada, equivalente a 2g de ceftazidima e avibactam sódico equivalente a 0,5g de avibactam, numa proporção fixa de 4:1, respetivamente (European Medicines Agency, 2022).

Com pouca ou nenhuma atividade contra a maioria dos microrganismos Gram-positivos e anaeróbios (Shirley & Shirley, 2018), este antibiótico é indicado no tratamento de utentes adultos e pediátricos (idade igual ou superior a três meses), quando o seu quadro clínico seja de infeção intra-abdominal complicada, infeção do trato urinário complicada (incluindo pielonefrite) e pneumonia nosocomial (incluindo pneumonia associada a ventilação mecânica) (Tabela 7) (European Medicines Agency, 2022).

Dados *in vitro*, sem significado clínico conhecido, evidenciaram a capacidade de Zavicefta em combater sete outras espécies bacterianas Gram-negativas, na ausência de mecanismos de resistência adquiridos, as quais, *Citrobacter koseri*, *Morganella morganii*,

Proteus vulgaris, *Providencia rettgeri* e *Klebsiella aerogenes* (European Medicines Agency, 2022).

Tabela 7 - Microrganismos suscetíveis ao Zavicefta por cada tipo de infecção, tanto *in vitro*, como em contexto de infecção clínica (European Medicines Agency, 2022).

Infeções intra-abdominais complicadas	Bactérias Gram-negativas Aeróbias e facultativas	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Infeções do trato urinário complicadas		<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pneumonia nosocomial		<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

5.3. Materiais fornecidos

À semelhança do que acontece no programa SMART, também no ATLAS, no início de qualquer ano civil o IHMA envia, a cada um dos participantes, todos os materiais indispensáveis à compreensão e realização dos procedimentos, que os mesmos, necessitam de realizar de forma a colaborar com este estudo epidemiológico.

Estes materiais incluem um dossiê onde se pode encontrar uma breve revisão literária sobre os motivos que levam a realização deste estudo epidemiológico a ser tão importante e necessário, bem como os objetivos definidos, pelo programa, para esse ano. Ainda integrado neste dossiê encontramos um manual de procedimentos, os objetivos e critérios de seleção que cada participante deve cumprir, bem como um cronograma e todos os documentos necessários ao envio dos isolados (*Federal Express air waybill, Shipping Notification Form, Commercial Invoice Template, CDC Permit*).

Para além do dossiê, os laboratórios de microbiologia participantes deste estudo epidemiológico recebem 280 *Organism Report Forms*, 280 tubos de transporte (zaragatoas), 260 tubos de glicerol destinados ao armazenamento dos isolados, 15 sacos de transporte de isolados, três kits de envio de substâncias biológicas, entre outros materiais.

5.4. Seleção de isolados

Cada participante integrado no ATLAS tem como objetivo, a recolha, identificação, armazenamento e envio de um total de 272 isolados clínicos frescos que tenham origem em infeções intra-abdominais complicadas, infeções do trato urinário complicadas, infeções do trato respiratório inferior, infeções da corrente sanguínea ou infeções da pele e tecidos moles complicadas, infeções essas, adquiridas quer na comunidade quer em meio hospitalar. Os isolados e suas respetivas quantidades, requeridos por este estudo epidemiológico incluem bactérias Gram-negativas e Gram-positivas aeróbias ou facultativas.

A distribuição dos isolados Gram-negativos é a seguinte: 30 *Acinetobacter* spp., cinco *Citrobacter* spp., dez *Enterobacter* spp., 25 *Escherichia coli*, dez *Haemophilus influenzae*, 35 *Klebsiella* spp., cinco *Moraxella catarrhalis*, três *Morganella Morganii*, três *Proteus vulgaris*, três *Proteus mirabilis*, três *Providencia* spp., 40 *Pseudomonas aeruginosa* e cinco *Serratia marcescens*.

Já a distribuição dos isolados Gram-positivos é a seguinte: dez *Enterococcus faecalis*, cinco *Enterococcus faecium*, 45 *Staphylococcus aureus*, cinco *Staphylococcus epidermidis*, cinco *Staphylococcus haemolyticus*, 15 *Streptococcus pneumoniae* e dez *Beta-hemolytic Streptococci*.

5.4.1. Critérios de inclusão

Os isolados integrantes do ATLAS devem ser recolhidos e armazenados entre 1 de dezembro e 31 de dezembro do ano civil seguinte, devem ainda, ter relevância clínica, ou seja, cada isolado tem de ser considerado o provável agente causador da infeção em análise (Pfizer Inc., 2021). Vários organismos de uma amostra são aceitáveis, desde que cada um seja um microrganismo inicial único. Apenas o primeiro isolado de uma espécie particular por paciente para todo o período de colheita é aceitável. Mais especificamente, cada tipo de infeção possui os seus próprios critérios de inclusão (Pfizer Inc., 2021):

Infeções intra-abdominais complicadas: isolados pertencentes à lista de microrganismos requeridos, obtidos através de produtos biológicos de origem intra-abdominal (apêndice, peritoneu, cólon, bÍlis, fÍgado e pâncreas). Amostras obtidas através de paracentese também são aceites.

Infeções do trato urinário complicadas: isolados pertencentes à lista de microrganismos requeridos, obtidos através de produtos biológicos recolhidos do trato urinário (uréter, uretra, bexiga ou urina).

Infeções da corrente sanguínea: isolados pertencentes à lista de microrganismos requeridos, obtidos através de hemoculturas, independentemente do foco original de infecção.

Infeções do trato respiratório inferior: isolados pertencentes à lista de microrganismos requeridos, obtidos através de produtos biológicos recolhidos do trato respiratório inferior (lavado bronco-alveolar, escovado brônquico, aspirado endotraqueal, biopsia pulmonar e expetoração). Amostras obtidas por toracocentese também são aceites.

Infeções da pele e tecidos moles: isolados pertencentes à lista de microrganismos requeridos, obtidos através de produtos biológicos de pele ou tecidos moles (abcessos, furúnculos, carbúnculos, ferimentos, queimaduras, celulite, lesões impetiginosas e úlceras).

5.4.2. Critérios de exclusão

- Isolados considerados contaminantes.
- Isolados de fezes, abcesso perirretal ou drenos *in situ*
- Isolados pertencentes a espécies bacterianas diferente das definidas pelo protocolo.
- Isolados obtidos através de amostras ambientais ou de culturas de vigilância destinadas para fins de controlo da infecção.
- Isolados duplicados (mesmo género e espécie) obtidos através do mesmo paciente, independentemente de terem sido recolhidos do mesmo ou de locais diferentes do corpo, do padrão de suscetibilidade antimicrobiana ou do perfil fenotípico.
- Os isolados provenientes de infeções do trato urinário complicadas não podem ser mais de 20% do total dos isolados integrantes do estudo (até cinquenta e quatro isolados).

5.5. Requisition Forms

Cada um dos isolados integrantes do estudo epidemiológico deve ser acompanhado de um formulário (*Requisition Form*) destinado ao preenchimento de informações

demográficas, formulários estes, extremamente semelhantes aos do programa SMART. Neste formulário são preenchidos diversos campos de informação, tais como, o sexo e idade do utente, o tipo de produto biológico a partir do qual foi identificado o microrganismo e a sua data de colheita, o serviço no qual o utente se encontra e a sua data de admissão no mesmo, o tipo de microrganismo recolhido e o número identificativo da amostra no laboratório local. Estes formulários têm ainda uma etiqueta numerada com o mesmo número do formulário a que pertence, que posteriormente é utilizada para identificar o tubo de transporte, esta etiqueta deve ser preenchida com o número identificativo da amostra e um número codificador do microrganismo em causa (disponibilizado no próprio formulário). Mais recentemente e devido à atual situação pandémica, os formulários do ATLAS passaram a integrar uma zona de preenchimento opcional sobre a presença ou não de infeção causada pelo coronavírus SARS-COV-2, aquando da colheita do produto biológico, como exemplificado no Anexo 3.

Os *Requisition Forms* (REQ) são formulários OptiScan™ desenvolvidos pelo IHMA de modo a que a sua leitura seja possível com recurso a um rápido reconhecimento óptico de caracteres (Pfizer Inc., 2021). Como este reconhecimento é realizado por um computador, e não por um humano, é importante que os dados estejam exatamente na mesma localização física em todos os formulários para que sejam lidos com precisão. Por este motivo, e por cada formulário incorporar informações codificadas, que devem permanecer exclusivas, o uso de fotocópias é proibido. Cada formulário é numerado de forma individual (“IHMA Number” – número usado pelo IHMA como referência interna para cada isolado) e deve ser usado apenas uma única vez.

Estruturalmente, os REQ são formulário de folha duplicada destinados a preenchimento manual, aquando do envio dos isolados recolhidos, a folha original (branca) de cada formulário, é enviada em conjunto com o seu respetivo isolado, enquanto a cópia (folha amarela) fica armazenada no laboratório de microbiologia dos participantes.

Embora o reconhecimento ótico de caracteres seja muito eficiente, o sucesso e a precisão do processo são aprimorados pelo seguimento de algumas regras básicas:

- Escrita de números e letras (quando necessário) legíveis e dentro dos espaços a elas destinados.
- Preenchimento total dos círculos de resposta, o seu preenchimento com cruces ou certos não é válido.
- Apenas é permitida a utilização de canetas esferográficas para o preenchimento dos formulários, a utilização de lápis ou marcadores não é válida.
- Caso ocorra um erro no preenchimento de um formulário, este deve ser descartado, sendo as informações demográficas referentes ao isolado em causa, descritas no formulário seguinte.

5.6. Envio

O ATLAS, apresenta um cronograma de envio, que contempla três envios separados. Este cronograma deve ser seguido pois ajudará a garantir a viabilidade máxima dos isolados submetidos. No protocolo com início a 1 de dezembro de 2021, os envios estão programados da seguinte forma (Pfizer Inc., 2021):

- Primeiro envio: de 1 a 30 de maio de 2022
- Segundo envio: de 1 a 31 de outubro de 2022
- Terceiro envio: de 1 a 31 de janeiro de 2023

É importante relembrar que segundo os critérios de inclusão, os isolados submetidos neste último envio devem ter sido colhidos e armazenados até 31 de dezembro de 2022.

Os isolados recolhidos por cada laboratório participante são enviados para o Laboratório Central do IHMA, em Schaumburg, Illinois, preferencialmente pela transportadora *Federal Express* (FedEx) que possui regulamentos de transporte internacionais de substâncias biológicas (categoria B). As informações necessárias ao preenchimento do conhecimento de embarque aéreo (*air waybill*), como o endereço de envio, informações biológicas, peso e dimensões estão já pré-inseridas neste documento. No entanto, em envios internacionais é requerida a assinatura conhecimento de embarque aéreo e provisão da fatura comercial (*Commercial Invoice*).

6. Capítulo III - *Sentry Antimicrobial Surveillance Program*

6.1. Contextualização do estudo epidemiológico

Ativo desde a sua criação em 1997, o SENTRY é o principal programa de vigilância antimicrobiana da JMI Laboratories. Este estudo epidemiológico monitoriza, globalmente, variados microrganismos patogénicos e as mudanças nos seus padrões de suscetibilidade ao longo do tempo (JMI Laboratories, s.d.-b).



Figura 8 - Logótipo do *Sentry Antimicrobial Surveillance Program*.

Com sede em North Liberty, Iowa, a JMI Laboratories é um laboratório de microbiologia de referência certificado pela *Clinical Laboratory Improvement Amendments* que apoia o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, através da oferta de programas de vigilância antimicrobiana, estudos moleculares e apoio a ensaios clínicos e investigações do microbioma (JMI Laboratories, s.d.-a).

O conceito inicial do programa SENTRY, nasceu em 1994, quando a *American Society for Microbiology*, recomendou a criação de uma *task-force*, destinada à discussão do aumento das resistências antimicrobianas e da falta de agentes antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infeções emergentes. Desde a sua implementação, o programa de vigilância antimicrobiana da JMI Laboratories já contribuiu com a publicação de mais de 400 artigos em revistas especializadas da área e inúmeras apresentações em conferências científicas internacionais (Fuhrmeister & Jones, 2019), onde deu a conhecer diferentes descobertas científicas, entre elas:

- A existência de estirpes de *Escherichia coli* positivas para *mcr-1* (gene cuja expressão confere resistência à colistina) nos Estados Unidos, corroborada pela deteção de um isolado de *Escherichia coli* positivo para este gene, responsável pela

infecção no trato urinário de um utente hospitalizado na Pensilvânia (Castanheira et al., 2016).

- Mudanças importantes nos perfis epidemiológicos e de suscetibilidade antimicrobiana de diversos serótipos de *Streptococcus pneumoniae* antes e após a introdução da vacina pneumocócica PCV13 (Mendes et al., 2014).

Entre 1997 e 2016, o programa SENTRY recolheu mais de 750 mil isolados clínicos, de mais de 400 centros médicos globalmente distribuídos (Diekema et al., 2019).

Atualmente conta com a colaboração de mais de 150 participantes, que incluem laboratórios nos Estados Unidos, América Latina, Europa e Ásia (Streit et al., 2022).

Apesar de todo o estudo epidemiológico estar encarregue da JMI Laboratories, o mesmo pode ser financiado por diversas outras empresas farmacêuticas, que queiram comprar determinados dados de vigilância que permitam satisfazer as suas necessidades regulatórias e científicas, ou até, integrar novos compostos antimicrobianos em desenvolvimento neste estudo epidemiológico (Fuhrmeister & Jones, 2019; JMI Laboratories, s.d.-c; Streit et al., 2022).

6.2. Objetivos

O programa de vigilância antimicrobiana da JMI Laboratories apresenta como objetivo geral, a monitorização dos padrões de suscetibilidade de diversos microrganismos. Mais especificamente, tem como objetivos (Streit et al., 2022):

- Determinar a frequência e resistência antimicrobiana entre microrganismos responsáveis por infeções da corrente sanguínea/ infeções da pele e tecidos moles/ infeções do trato urinário/ infeções intra-abdominais.
- Avaliar a resistência antimicrobiana de isolados de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp. e *Moraxella catarrhalis* responsáveis por infeções do trato respiratório adquiridas na comunidade.
- Determinar a frequência e resistência antimicrobiana entre microrganismos isolados a partir de utentes hospitalizados com pneumonia.

- Avaliar os padrões de resistência antimicrobiana de isolados de *Acinetobacter* spp., *Haemophilus parainfluenza*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* responsáveis por infecções diferentes das mencionadas no primeiro ponto.

6.3. Materiais fornecidos

A JMI Laboratories fornece, aos participantes, todo o material necessário à compreensão e realização dos procedimentos, que os mesmos necessitam de realizar de forma a colaborar com este estudo epidemiológico.

Estes materiais incluem um documento digital onde se pode encontrar uma breve descrição do estudo epidemiológico e do seu propósito, bem como, os objetivos e critérios de seleção que cada participante deve cumprir. Para além deste documento, os laboratórios de microbiologia participantes recebem sete diferentes modelos de formulários demográficos em formato digital, 500 tubos de transporte (zaragatoas), cinco recipientes cilíndricos de plástico, bem como cinco caixas de cartão destinadas ao envio dos isolados a submeter, entre outros materiais. A JMI Laboratories envia ainda, diversas etiquetas numeradas conforme os formulários fornecidos, destinadas ao preenchimento manual do número identificativo de cada amostra, para que possam ser aplicadas nos tubos de transporte.

6.4. Seleção de isolados

Cada participante integrado no programa SENTRY tem como objetivo, a recolha, identificação, armazenamento e envio de um total de 450 isolados clínicos frescos consecutivos, distribuídos pelas seguintes categorias:

- Categoria A: 100 isolados de infeções da corrente sanguínea
- Categoria B: 35 *Streptococcus pneumoniae*, 15 *Haemophilus influenzae* e *parainfluenzae* e dez *Moraxella catarrhalis*
- Categoria C: 100 isolados de infeções do trato respiratório inferior
- Categoria D: 90 isolados de infeções da pele e tecidos moles
- Categoria E: 50 isolados de infeções do trato urinário
- Categoria Q: 30 isolados de infeções intra-abdominais
- Categoria X: 15 *Acinetobacter* spp., dois *Haemophilus parainfluenza*, duas *Stenotrophomonas maltophilia* e uma *Burkholderia cepacia*.

Em adição a estas sete classes, o estudo epidemiológico SENTRY apresenta mais uma categoria, a categoria F, de carácter opcional, destinada à recolha de fungos.

6.4.1. Critérios de Inclusão

Os isolados integrantes de cada uma das categorias devem ser recolhidos e armazenados desde janeiro até 15 de outubro do respetivo ano civil, devem ainda, ter relevância clínica, ou seja, cada isolado tem de ser considerado o provável agente causador da infeção em análise. Mais especificamente, cada categoria possui os seus próprios critérios de inclusão:

Categoria A: são aceites as primeiras 20 bactérias Gram-positivas/negativas aeróbias ou facultativas, obtidas através de hemoculturas, de cada mês, durante cinco meses, perfazendo o total de 100 isolados requeridos para esta categoria.

Categoria B: isolados de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* e *Moraxella catarrhalis* obtidos através de produtos biológicos recolhidos do trato respiratório de utentes com infeção respiratória adquirida na comunidade.

Categoria C: bactérias Gram-positivas/negativas aeróbias ou facultativas obtidas através de produtos biológicos recolhidos por procedimentos invasivos (aspirado transtraqueal, lavado bronco-alveolar, aspirado brônquico, entre outros) são preferíveis, mas isolados de amostras de expetoração que respeitem os parâmetros de qualidade convencionais – ter menos de dez células epiteliais pavimentosas e mais de 25 neutrófilos por campo no microscópio ótico (objetiva 10x), também são aceites.

Categoria D: bactérias Gram-positivas/negativas aeróbias ou facultativas obtidas através de produtos biológicos recolhidos por procedimentos invasivos (biopsias ou aspirados) são preferíveis, mas exsudados também são aceites.

Categoria E: bactérias Gram-positivas/negativas aeróbias ou facultativas, obtidas através de produtos biológicos recolhidos do trato urinário, cujo exame cultural apresente contagens significativas de colónias (> 100.000 UFC/mL).

Categoria Q: bactérias Gram-positivas/negativas aeróbias obtidas através de produtos biológicos de origem intra-abdominal.

Categoria X: isolados de *Acinetobacter* spp., *Haemophilus parainfluenza*, *Strenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* de qualquer tipo de infecção que não esteja incluído nas restantes categorias.

6.4.2. Critérios de Exclusão

À semelhança dos restantes estudos epidemiológicos abordados neste relatório de estágio, não são aceites isolados duplicados (mesmo género e espécie) obtidos através do mesmo paciente, independentemente de terem sido recolhidos do mesmo ou de locais diferentes do corpo, do padrão de suscetibilidade antimicrobiana ou do perfil fenotípico.

6.5. Formulários

Para cada um dos isolados integrantes do estudo epidemiológico deve ser preenchido um formulário demográfico. Neste formulário são preenchidos diversos campos de informação, tais como, o sexo e idade do utente, o tipo de produto biológico a partir do qual foi identificado o microrganismo e a sua data de colheita, o serviço no qual o utente se encontra e a sua data de admissão no mesmo, o tipo de microrganismo recolhido e o número identificativo da amostra no laboratório local, como exemplificado no Anexo 4.

Para cada categoria existe um modelo de formulário, sendo estes muito semelhantes entre as diferentes categorias, existindo apenas alterações de maior nos formulários da categoria A e da categoria C. Para além dos parâmetros de preenchimento referidos no paragrafo anterior, os formulários da categoria A apresentam mais dois campos, sendo estes, qual o diagnóstico primário do utente e qual a fonte que despoletou a infeção da corrente sanguínea, já para os formulários da categoria C, os campos adicionais são: se o utente tem fibrose cística e se a infeção em causa está associada à utilização de ventilação mecânica.

Estruturalmente, os formulários são disponibilizados em formato digital e, da mesma forma, destinados ao preenchimento digital, aquando do envio, estes devem ser impressos e enviados em conjunto com os isolados recolhidos.

6.6. Envio

Ao contrário dos restantes estudos abordados, o SENTRY, não apresenta um cronograma de envio, sendo solicitado apenas que todas as estirpes sejam enviadas até dia 15 de outubro do respetivo ano. É também recomendado que o seu envio se faça por duas

ou três vezes ao longo do período do mesmo, para garantir o máximo de viabilidade das estirpes submetidas.

Os isolados recolhidos por cada laboratório participante são enviados para o Laboratório Central de referência da JMI Laboratories, preferencialmente pela transportadora *Federal Express* (FedEx) que possui regulamentos de transporte internacionais de substâncias biológicas (categoria B). Os documentos necessários ao envio, como é o caso do conhecimento de embarque aéreo (*air waybill*), são facultados pelo próprio programa.

7. Conclusão

Desde 1 de janeiro a 23 de maio de 2022 o laboratório de microbiologia do Hospital Infante D. Pedro selecionou, recolheu e armazenou um total de 794 isolados: 362 destinados a integrar o programa SENTRY, 204 destinados a integrar o programa SMART e 228 destinados a integrar o programa ATLAS. Dessa soma, 721 completaram o total de isolados submetidos no primeiro envio do ano, que teve lugar no final de abril, de modo a cumprir com os cronogramas fornecidos, os quais foram distribuídos da seguinte forma:

SMART: enviados 187 isolados repartidos pelos diferentes tipos de infeção (infeções intra-abdominais: 50; infeções do trato urinário: 50; infeções da corrente sanguínea: 50; infeções do trato respiratório: 37).

ATLAS: enviados 221 isolados, dos quais, 76 bactérias Gram-positivas e 145 bactérias Gram-negativas.

SENTRY: enviados 313 isolados repartidos entre as diferentes categorias (Categoria A: 71; Categoria B: 7; Categoria C: 62; Categoria D: 90; Categoria E: 50; Categoria Q: 30; Categoria F: 3).

A análise dos isolados integrantes do programa SENTRY (que solicita a recolha de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas) permite ter uma visão geral da epidemiologia que afeta o Centro Hospitalar do Baixo Vouga e a região de Aveiro. Permitindo retirar as seguintes conclusões:

- As infeções da corrente sanguínea e da pele e tecidos moles são igualmente causadas por microrganismos Gram-negativos (principalmente *Escherichia coli*) e Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*).
- Os agentes causadores de pneumonia são maioritariamente bactérias Gram-negativas, predominantemente *Pseudomonas aeruginosa*.
- A *Echerichia coli* é o principal microrganismo causador de infeções do trato urinário.
- As infeções intra-abdominais são igualmente causadas por microrganismos Gram-negativos (*Escherichia coli*) e Gram-positivos (*Enterococcus faecalis*).

Através da colaboração de um crescente número de centros médicos distribuídos por todo o mundo, os laboratórios responsáveis por avaliar os isolados submetidos, auxiliam no desenvolvimento de novos medicamentos, fornecendo dados que permitem detetar o surgimento de novos fenótipos e mecanismos de resistência, prever tendências de resistência, monitorizar o impacto da introdução de novos agentes antimicrobianos na prática clínica, identificar surtos e estabelecer medidas de controlo de infeção e saúde pública (Sader *et al.*, 2019).

A realização deste estágio foi uma mais-valia tanto a nível académico como pessoal, permitindo-me obter mais conhecimentos no que respeita aos métodos convencionais utilizados na microbiologia clínica e restantes métodos utilizados, bem como desenvolver mecanismos de organização, gestão de tempo e sentido de responsabilidade.

8. Referências

Amezquita, J. N. & Camargo (2017). Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. *Boletín CONAMED - OPS*, 11, 3–9.

AMR Industry Alliance. (s.d.). Pfizer - Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS). <https://www.amrindustryalliance.org/case-study/antimicrobial-testing-leadership-and-surveillance-atlas/>

AMR Industry Alliance. (2017). Merck & Co., Inc. - Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends - AMR Industry Alliance. <https://www.amrindustryalliance.org/case-study/study-for-monitoring-antimicrobial-resistance-trends-smart/>

AMR Research Initiative. (s.d.). ATLAS Programme. AMR RESEARCH INITIATIVE. <https://amr.theodi.org/programmes/atlas>

Bayarski, Y. (1928). *Antibiotics and Their Types , Uses and Side Effects*. 6.

Bhalodi, A. A., Crandon, J. L., Williams, G., & Nicolau, D. P. (2014). Supporting the ceftaroline fosamil/avibactam Enterobacteriaceae breakpoint determination using humanised in vivo exposures in a thigh model. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.07.021>

BioMérieux. (s.d.). Meios de cultura convencionais. <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-convencionais>

Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A focus on current challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>

Bottery, M. J., Pitchford, J. W., & Friman, V. P. (2021). Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *ISME Journal*, 15(4), 939–948. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00832-7>

Castanheira, M., Griffin, M. A., Deshpande, L. M., Mendes, R. E., Jones, R. N., & Flamm, R. K. (2016). Detection of mcr-1 among Escherichia coli clinical isolates collected worldwide as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(9), 5623–5624. <https://doi.org/10.1128/AAC.01267-16>

Castanheira, M., Sader, H. S., Farrell, D. J., Mendes, R. E., & Jones, R. N. (2008). *Activity of Ceftriaxone-Avibactam Tested against Gram-Negative Organism Populations , including Strains Expressing One or More β -Lactamases and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carrying Various Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00817-12>

Centerlab. (2020). Resistência Microbiana e Inovações na Detecção Precoce. https://www.centerlab.com/blog/Centernews_123/

Centro Hospitalar do Baixo Vouga. (s.d.-a). Serviços Clínicos. <https://www.chbv.min-saude.pt/servicos-clinicos/>

Centro Hospitalar do Baixo Vouga. (s.d.-b). Serviços Clínicos - Patologia Clínica. <https://www.chbv.min-saude.pt/servicos-clinicos/patologia-clinica/>

Creative Proteomics. (s.d.). MALDI-TOF Mass Spectrometry. <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>

Davies, O. L. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Diário da República. (2016). Despacho n.º 6401/2016. Programas de Saúde Prioritários. *Diário Da República, 2.ª Série — N.º 94 — 16 de Maio de 2016*, 15239.

Diário de Notícias. (2018). Até 2050 mais de 40 mil portugueses podem morrer por resistência a antibióticos. <https://www.dn.pt/vida-e-futuro/mais-de-40-mil-mortes-em-portugal-por-resistencias-a-antibioticos-ate-2050---ocde-10142395.html>

Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Shortridge, D., Zervos, M., & Jones, R. N. (2019). *Twenty-Year Trends in Antimicrobial Susceptibilities Among Staphylococcus aureus From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. 6(Suppl 1), 47–53. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy270>

Direção-Geral da Saúde. (2018). *Mortalidade em Portugal*.

Dowzicky, M. J. (2019). ATLAS: Fully - searchable Global Antibiotic Resistance Database to Fight AMR. *Pfizer Hospital*, 1–11.

Drug Discovery and Development. (2016). Pfizer Completes Acquisition of Small Molecule Anti-Infective Business From AstraZeneca - Drug Discovery and Development. <https://www.drugdiscoverytrends.com/pfizer-completes-acquisition-of-small-molecule-anti-infective-business-from-astrazeneca/>

Drugs.com. (s.d.). Tygacil FDA Approval History.
<https://www.drugs.com/history/tygacil.html>

EMA. (2022). INVANZ, INN-ertapenem. *European Medicines Agency*, 1–32.
<https://doi.org/10.1201/9780203971093.bmatt>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. <http://www.eucast.org>.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 10.0, 2022 www.eucast.org

European Medicines Agency. (2021). *Zinforo: EPAR -Product Information*. 1–31.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zinforo-epar-product-information_en.pdf

European Medicines Agency. (s.d.). Tygacil.
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tygacil#authorisation-details-section>

European Medicines Agency. (2022). *Zavicefta: EPAR - Product Information*. 1–39.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zavicefta-epar-product-information_en.pdf

Frilabo. (s.d.). Cryoinstant Mixed. <https://www.frilabo.pt/produto/vibakstore-50-un/>

Fuhrmeister, A. S., & Jones, R. N. (2019). *The Importance of Antimicrobial Resistance Monitoring Worldwide and the Origins of SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*.

6(Suppl 1), 1–4. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy346>

Giaccari, L. G., Pace, M. C., Passavanti, M. B., Gargano, F., Aurilio, C., & Sansone, P. (2021). Ceftolozane/tazobactam for resistant drugs pseudomonas aeruginosa respiratory infections: A systematic literature review of the real-world evidence. *Life*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/life11060474>

Goldstein, E. J. C., Citron, D. M., Merriam, V. V., Warren, Y. A., Tyrrell, K. L., & Fernandez, H. (2002). Comparative in vitro activities of ertapenem (MK-0826) against 469 less frequently identified anaerobes isolated from human infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(4), 1136–1140. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1136-1140.2002>

Hall, B. G., & Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β -lactamases [1]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(6), 1050–1051. <https://doi.org/10.1093/jac/dki130>

Harris, M. (1964). Pharmaceutical microbiology. In *Journal of Medical Education* (Vol. 39, Issue 11). <https://doi.org/10.1097/00001888-196411000-00034>

Hasan, T. H., & Al-Harmoosh, R. A. (2020). Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11*(6), 817–823. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.118>

Hashemian, S., Farhadi, T., & Mojdeh, G. (2018). *Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care*. 1759–1767.

Instituto Nacional de Estatística. (n.d.). Óbitos por Local de residência, Sexo, Grupo etário e Causa de morte.

https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008206&xlang=pt&contexto=bd&selTab=tab2

International Health Management Associates. (s.d.). About Us. <https://www.ihma.com/about-us/>

Jang, K. S., & Kim, Y. H. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *Journal of*

Microbiology, 56(4), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7457-0>

JMI Laboratories. (s.d.-a). Drug Development. <https://www.jmilabs.com/drug-development/>

JMI Laboratories. (s.d.-b). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. <https://www.jmilabs.com/sentry-surveillance-program/>

JMI Laboratories. (s.d.-c). SENTRY Microbiology Visualization Platform. JMI MVP. <https://sentry-mvp.jmilabs.com/>

Kappor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP>

Kaushik, D., Rathi, S., & Jain, A. (2011). International Journal of Antimicrobial Agents Ceftriaxone: a comprehensive update. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.017>

Koulenti, D., Song, A., Ellingboe, A., Abdul-Aziz, M. H., Harris, P., Gavey, E., & Lipman, J. (2019). Infections by multidrug-resistant Gram-negative Bacteria: What's new in our arsenal and what's in the pipeline? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(3), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.10.011>

Laudano, J. B. (2011). *Ceftriaxone fosamil : a new broad-spectrum cephalosporin. Figure 1*, 11–18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr095>

Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 50, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.006>

Livermore, D. M., Carter, M. W., Bagel, S., Wiedemann, B., Baquero, F., Loza, E., Endtz, H. P., Van Braak, N. Den, Fernandes, C. J., Fernandes, L., Fridodt-Moller, N., Rasmussen, L. S., Giamarellou, H., Giamarellos-Bourboulis, E., Jarlier, V., Nguyen, J., Nord, C. E., Struelens, M. J., Nonhoff, C., ... Shungu, D. L. (2001). In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against recent clinical bacteria collected in Europe and Australia.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(6), 1860–1867.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1860-1867.2001>

Ma, F., Xu, S., Tang, Z., Li, Z., & Zhang, L. (2021). Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health*, 3(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004>

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Manual MSD. (s.d.). Sobre os Manuais MSD. Manual MSD - Versão Saúde para a Família. <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/resourcespages/about-the-manuals>

Mendes, R. E., Costello, A. J., Jacobs, M. R., Critchley, I. A., & Jones, R. N. (2014). Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of USA *Streptococcus pneumoniae* isolates collected prior to and post introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.020>

Merck & Co. (2020). *DELIVERING ON OUR COMMITMENTS MSD ' S ACTIONS TO ADDRESS. December.*

Merck & Co. (2021). *Addressing a global public health threat: Antimicrobial Resistance.* 1–12.

Merck & Company. (2022, janeiro de). Microbiology Laboratory Study Protocol. Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends, An Antimicrobial Susceptibility Study to Compare In vitro Activity of Ertapenem, Zerbaxa and Comparative Agents.

Merck Sharp & Dohme Corp. (2020). Zerbaxa. *Merck Canada Inc.*, 1–41.

Merck Sharp & Dohme Corp. (2022). INVANZ. *Merck & Co., Inc.*, 1–20.

Merck. (s.d.). History - Our history. <https://www.merck.com/company-overview/history/>

Michalik, S. (2017). Como é que o VITEK® 2 cria valores de CMI? BIOMÉRIEUX iNEWS. <https://www.biomerieux-microbio.com/pt-pt/como-e-que-o-vitek-2-cria-valores-de-cmi/>

Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., Arimondo, P. B., Glaser, P., Aigle, B., Bode, H. B., Moreira, R., Li, Y., Luzhetskyy, A., Medema, M. H., Pernodet, J. L., Stadler, M., Tormo, J. R., Genilloud, O., Truman, A. W., ... Müller, R. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, 5(10), 726–749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>

Morrissey, I., Hackel, M., Badal, R., Bouchillon, S., Hawser, S., & Biedenbach, D. (2013). *A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011*. 1335–1346. <https://doi.org/10.3390/ph6111335>

Nogueira Santo, H., Xavier, A. R. E. de O., Xavier, M. A. de S., Carvalho, A. A., Monção, G. A., & Barreto, N. A. P. (2016). Antibacterianos : Principais Classes , Mecanismos De Ação E Resistência. *Revista Unimontes Científica*, 18(2), 96–108. <http://ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/523>

Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. December.*

OPAN. (2017). *OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente.* Organização Pan-Americana Da Saúde. <https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>

Organização Mundial da Saúde. (2020). *A falta de novos antibióticos compromete os*

esforços globais para conter infecções resistentes a medicamentos.
<https://www.who.int/es/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>

Penela, R. (2021). *Consumo de antibióticos baixa 23% em 2020. Portugueses gastaram menos 2,2 milhões em medicamentos.* Observador.
<https://observador.pt/2021/03/11/consumo-de-antibioticos-baixa-23-em-2020-portugueses-gastaram-menos-22-milhoes-em-medicamentos/>

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–21.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

Peterson, L. R. (2008). A review of tigecycline the first glycylycylcline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, S215–S222. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70005-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70005-6)

Pfizer Inc. (novembro 2021). Microbiology Laboratory Study Protocol. Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance, An Antimicrobial Susceptibility Study to Compare the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents Worldwide.

Pfizer Portugal. (s.d.). Pfizer em Portugal. <https://www.pfizer.pt/pt-pt/pfizer-em-portugal>

Pfizer. (2003). Pfizer and Pharmacia Merger.
https://www.pfizer.com/about/history/pfizer_pharmacia

Pfizer. (2016). Pfizer Completes Acquisition of Small Molecule Anti-Infective Business From AstraZeneca. https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer_completes_acquisition_of_small_molecule_anti_infective_business_from_astrazeneca

Pfizer. (2017). *Pfizer's ATLAS Surveillance Database: a Key Tool in the Fight against AMR.* https://www.pfizer.com/sites/default/files/investors/financial_reports/annual_reports/2017/assets/media/ATLAS_Infographic.pdf

Pfizer. (s.d.). Company Timeline: a Legacy of Innovation. Pharmacia & Upjohn Company. (2014). *ZYVOX safely and effectively*. 3, 1–24.

<https://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=649#section-11.4>

Repositório Comum. (s.d.). CHBV - Centro Hospitalar Baixo Vouga, E.P.E. <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/34227>

Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

Rose, W. E., Pharm, D., Rybak, M. J., & Pharm, D. (2006). *Tigecycline : First of a New Class of Antimicrobial Agents*.

Rusu, A., & Lungu, I.-A. (2020). The new fifth-generation cephalosporins – a balance between safety and efficacy. *Romanian Journal of Pharmaceutical Practice*, 13(3), 121–126. <https://doi.org/10.37897/rjphp.2020.3.2>

Sader, H. S., Flamm, R. K., & Jones, N. (2013). *Antimicrobial Activity of Ceftaroline-Avibactam Tested against Clinical Isolates Collected from U . S . Medical Centers in 2010-2011*. 57(4), 1982–1988. <https://doi.org/10.1128/AAC.02436-12>

Sader, H. S., Jones, R. N., Dowzicky, M. J., & Fritsche, T. R. (2005). *Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit*. 52, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.05.002>

Sader, H. S., Rhomberg, P. R., Fuhrmeister, A. S., Mendes, R. E., Flamm, R. K., & Jones, R. N. (2019). Antimicrobial resistance surveillance and new drug development. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Suppl 1), S5–S13. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy345>

Santana, R. C. (2018). Antibióticos beta-lactâmicos. *Curso Básico de Antimicrobianos. Divisão de MI-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP*.

Shirley, M., & Shirley, M. (2018). Ceftazidime-Avibactam : A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*, 78(6), 675–692. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0902-x>

Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - Journal of Medical Society*, 32(1), 76–77. https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17

Serviço Nacional de Saúde. (2021). Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE. <https://www.sns.gov.pt/entidades-de-saude/centro-hospitalar-do-baixo-vouga-epe/>

SNS, D. O., & Convencionadas, E. E. (2020). *Relatório Anual*.

Streit, J., Sader, H., Castanheira, M., Mendes, R., & Shortridge, D. (2022). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program for Europe. JMI Laboratories, SENTRY Antimicrobial Surveillance.

Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>

Wyeth Pharmaceuticals. (2021). *TYGACIL- tigecycline injection, powder, lyophilized, for solution*. <https://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=5885#S1.2>

Wyeth Pharmaceuticals. (2022). *ZINFORO, ceftarolina fosamila*. 1–17.

Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>

Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Denisuik, A., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J., Lynch, J. P., & Karlowsky, J. A. (2013). *Ceftazidime-Avibactam : a Novel Cephalosporin/β-lactamase Inhibitor Combination*. 159–177. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0013-7>

Anexos

Anexo 1: Manual de procedimentos de preparação dos isolados para o envio, disponibilizado pelo SMART (Merck & Company, 2022).

Isolate Preparation for transporting – all organisms

Each study site will receive Charcoal Swab. Only culture swabs approved by IHMA should be used for the transport of study isolates. Isolates that have been frozen should be removed from the freezer, sub-cultured twice (passed two [2] times) and inoculated to the provided Charcoal Swab for shipping to the Central Laboratory. The following procedure should be followed in preparing isolates for shipping:

- Frozen isolates should be removed from the freezer in the supplied TSB with glycerol tubes (**Figure 27**) and prepared for subculturing. Frozen isolates should be returned to the freezer as quickly as possible.



Figure 27

- Scrape a small amount of isolate from the frozen TSB with glycerol tube (using a loop) on to a non-selective media such as Blood Agar or Chocolate Agar plate (**Figure 28**). Return the TSB vial to the freezer immediately to ensure continued viability of the organism.

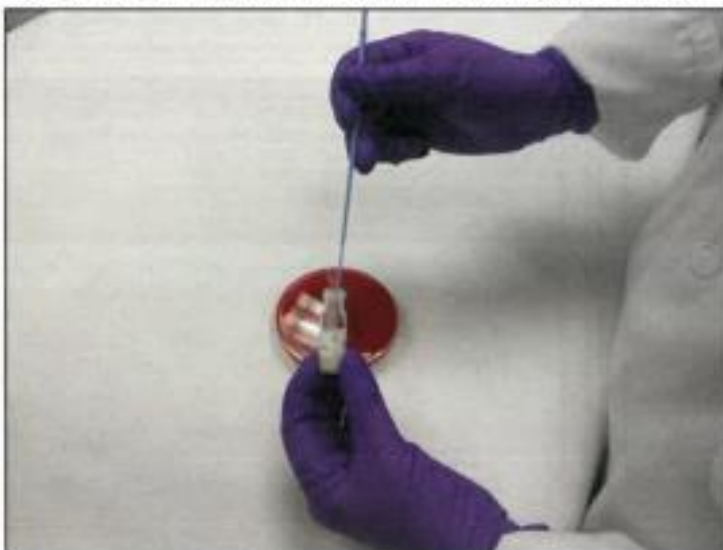


Figure 28

- Place the isolate from the TSB with glycerol on to the agar plate and perform an isolation streak (**Figure 29**) Incubate the agar plate for 16-24 hours in the appropriate incubation conditions

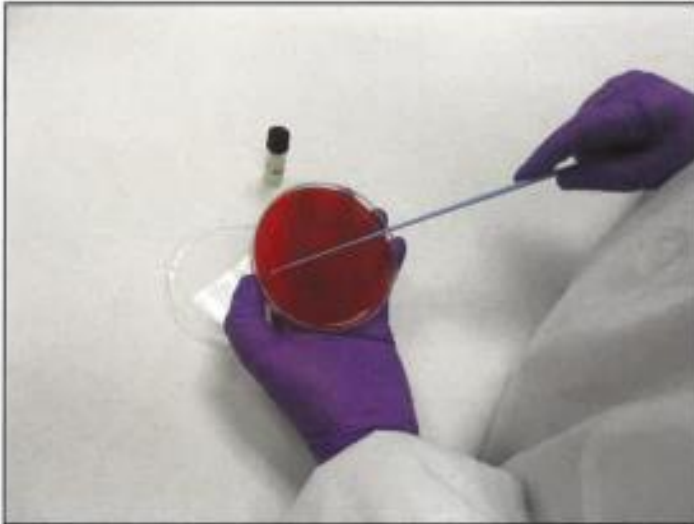


Figure 29

- Subculture the isolate a second time from the agar plate and incubate 16-24 hours - double pass (**Figure 30**).



Figure 30

- Each Charcoal Swab transport tube contains two parts: the charcoal media tube and a sterile swab with a cap. When preparing to inoculate the Charcoal Swab, carefully remove the Charcoal Swab tube, while leaving the sterile swab securely within the provided packaging. (Figure 31)



Figure 31

- Place the completed label (see Section VI for information on completing labels) on the Charcoal Swab (Figure 32). Ensure the isolate number on the label matches the number on the REQ for that isolate (Figure 36).



NOTE: Orientation of the transport label MUST be parallel to the Charcoal Swab so the bar code appears as shown in Figure 34.

Figure 32

- Remove the sterilization cap of the Charcoal Swab and discard. Once the cap is removed be cautious to keep the transport tube upright during the inoculation process as to avoid possible contamination. (Figure 33)



Figure 33

- Heavily inoculate the sterile swab with morphologically similar bacteria from the growth plate. Insert the swab into the BBL CultureSwab. (Figure 34)

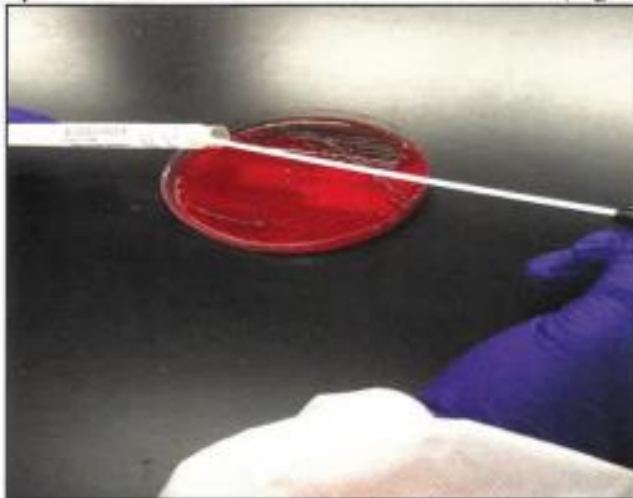


Figure 34

- Firmly press the cap of the sterile swab into the BBL CultureSwab until you hear or feel a 'click'. This will ensure the transport tube is sealed and protect against contamination during the transport of the bacterial strain to the central laboratory. (Figure 35)



Figure 35

Example of Completed Label and Charcoal Swab

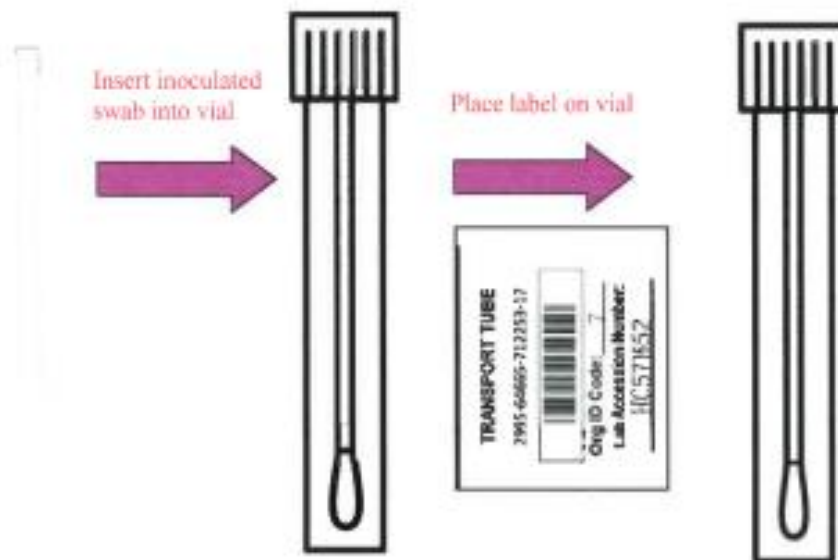


Figure 36

NOTE!! Do not leave the cap off a Charcoal Swab for more than ten (10) seconds. Do not tip the vial or lay it on its side when cap is removed. Do not incubate the tube after inoculation.

Packing Procedure

All isolates are required to be shipped in a Specimen Transport Bag and Outer box. Only UN approved shipping materials provided by IHMA are allowed for shipping the isolates. IHMA has provided the Specimen Transport Bag with the study supply kit. Isolates that are ready for shipment should be pack in the supplied materials (see **Figure 37**) and in accordance with the complete instructions on packing isolates for shipping located in **Appendix E**.

Isolate Packing Instructions

The procedure outlined below should be followed when packing organisms for shipment:

Follow this procedure for BBL CultureSwab transport tube

- Insert an absorbent pad into the Specimen Transport Bag.
- Place no more than twenty (20) BBL CultureSwab transport tubes into each Specimen Transport Bag.
- Seal the Specimen Transport Bag by removing the paper over the adhesive strip.
- Fold over the upper flap to seal the slit opening and affix the flap securely.
- Place no more than five (5) Specimen Transport Bag inside the Outer box. Surround the Specimen Transport Bags with cushioning material if needed.
- Place the REQ document envelope containing the completed REQs into the Outer box.
- Place the Itemized List of Contents in the Outer Box prior to sealing the box for shipping. This can be found in **Appendix I** of the protocol binder.
- Tape the Outer box securely. Complete shipping paperwork located in **Appendix I** and affix to the outside of the box using the document pouch.

NOTE!! The Specimen Transport Bag and Outer Box must be used for all shipments even if only one isolate is being shipped. The Outer Box is marked with all the correct indicators for compliance with IATA/ICAO regulations.

REMAINDER OF PAGE LEFT BLANK

Example Isolate Packaging and Shipping Materials

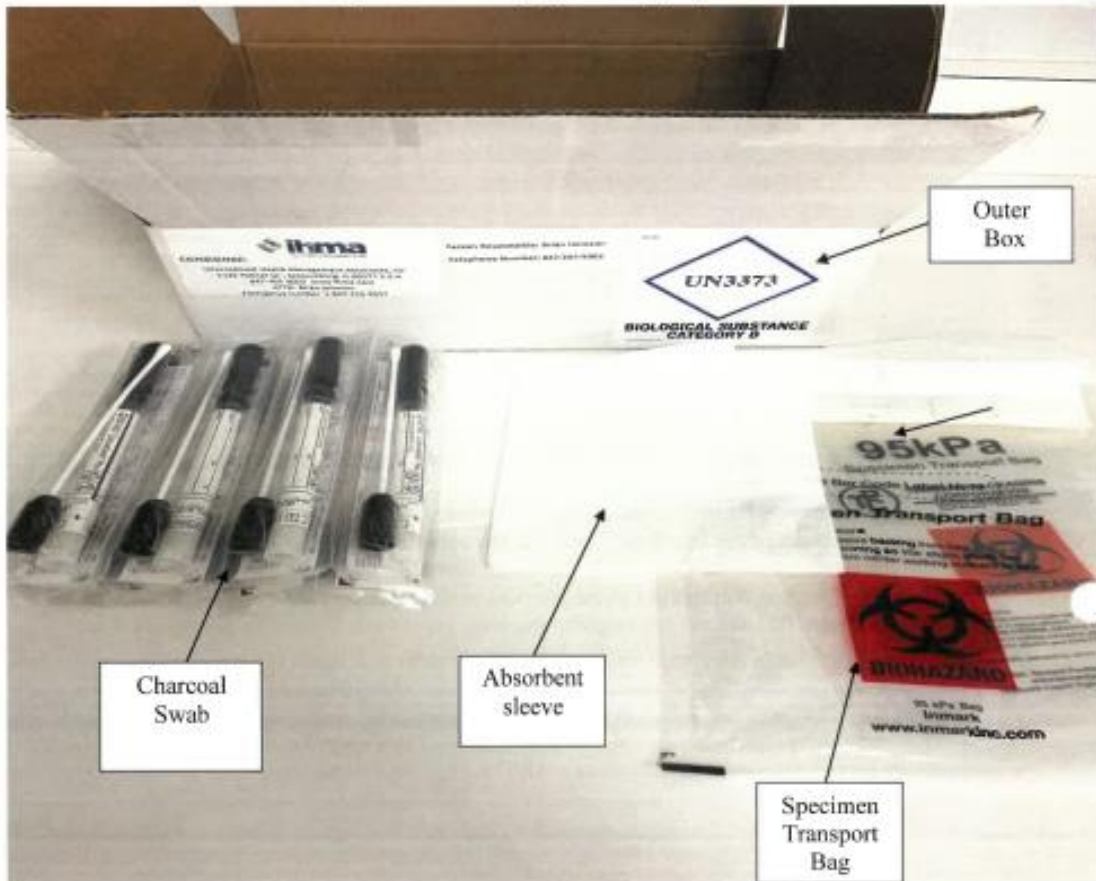



Figure 37

NOTE!! Packing instructions follow IATA/ICAO guidelines for Category B Biological Substances and must be strictly adhered to.

Anexo 2: Exemplo de um *Requisition Form* do SMART.




International Health Management Associates, Inc.
3300 Palace Drive
Baltimore, MD 21201
Tel: 410-351-0001
Fax: 410-351-0000

Requisition Form (REQ)
Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends
SMART

Subit: 1. 2013-14; 2. post culture only; 3. 10-14 days post

Patient Demographics				Isolate Demographics																											
Gender	Birth Year	Admission Date		Collection Date		IHMA Number																									
<input type="radio"/> Female <input type="radio"/> Male	<input type="text"/> OR Age <input type="text"/>	<input type="radio"/> 01 <input type="radio"/> 02 <input type="radio"/> 03 <input type="radio"/> 04 <input type="radio"/> 05 <input type="radio"/> 06 <input type="radio"/> 07 <input type="radio"/> 08 <input type="radio"/> 09 <input type="radio"/> 10 <input type="radio"/> 11 <input type="radio"/> 12 <input type="radio"/> 13 <input type="radio"/> 14 <input type="radio"/> 15 <input type="radio"/> 16	<input type="radio"/> 17 <input type="radio"/> 18 <input type="radio"/> 19 <input type="radio"/> 20 <input type="radio"/> 21 <input type="radio"/> 22 <input type="radio"/> 23 <input type="radio"/> 24 <input type="radio"/> 25 <input type="radio"/> 26 <input type="radio"/> 27 <input type="radio"/> 28 <input type="radio"/> 29 <input type="radio"/> 30 <input type="radio"/> 31 <input type="radio"/> 32	<input type="radio"/> JAN <input type="radio"/> FEB <input type="radio"/> MAR <input type="radio"/> APR <input type="radio"/> MAY <input type="radio"/> JUN <input type="radio"/> JUL <input type="radio"/> AUG <input type="radio"/> SEP <input type="radio"/> OCT <input type="radio"/> NOV <input type="radio"/> DEC	<input type="radio"/> 2021 <input type="radio"/> 2022	<input type="radio"/> 01 <input type="radio"/> 02 <input type="radio"/> 03 <input type="radio"/> 04 <input type="radio"/> 05 <input type="radio"/> 06 <input type="radio"/> 07 <input type="radio"/> 08 <input type="radio"/> 09 <input type="radio"/> 10 <input type="radio"/> 11 <input type="radio"/> 12 <input type="radio"/> 13 <input type="radio"/> 14 <input type="radio"/> 15 <input type="radio"/> 16	<input type="radio"/> JAN <input type="radio"/> FEB <input type="radio"/> MAR <input type="radio"/> APR <input type="radio"/> MAY <input type="radio"/> JUN <input type="radio"/> JUL <input type="radio"/> AUG <input type="radio"/> SEP <input type="radio"/> OCT <input type="radio"/> NOV <input type="radio"/> DEC	<input checked="" type="radio"/> 2022	<input type="text" value="21-123456-01"/> Sample Number <input type="text" value="21-123456"/>																						
Lab Accession Number <input type="text"/> (Store extra below blank)																															
Ward Type	Site of Isolation																														
<small>(Mark only one location)</small> <input type="radio"/> General Unspecified ICU <input type="radio"/> Medicine General <input type="radio"/> Medicine ICU <input type="radio"/> Emergency Room <input type="radio"/> Surgery General <input type="radio"/> Surgery ICU <input type="radio"/> Pediatric General <input type="radio"/> Pediatric ICU <input type="radio"/> Other	Blood <input type="radio"/> Blood OR <input type="radio"/> Other (A)	Intra-abdominal <input type="radio"/> Abdomen <input type="radio"/> Appendix <input type="radio"/> Colon <input type="radio"/> Diverticulum <input type="radio"/> Gall Bladder <input type="radio"/> Liver <input type="radio"/> Other (A)	<input type="radio"/> Peritoneum <input type="radio"/> Peritoneal Fluid <input type="radio"/> Rectum <input type="radio"/> Small Intestine <input type="radio"/> Stomach	Lower Respiratory Tract <input type="radio"/> Bronchial Swabbing <input type="radio"/> Bronchoalveolar Lavage (BAL) <input type="radio"/> Endotracheal aspirate <input type="radio"/> Lung Biopsy <input type="radio"/> Sputum <input type="radio"/> Thoracentesis <input type="radio"/> Other (LRT)	Urinary Tract <input type="radio"/> Kidney <input type="radio"/> Prostate <input type="radio"/> Ureter <input type="radio"/> Urethra <input type="radio"/> Urinary Bladder <input type="radio"/> Ureth <input type="radio"/> Other (UTI)																										
Gram-Negative Species Name																															
<input type="radio"/> Acinetobacter baumannii (809) <input type="radio"/> Acinetobacter jelskii (1314) <input type="radio"/> Acinetobacter nosocomialis (1320) <input type="radio"/> Acinetobacter sp. (38) <input type="radio"/> Aeromonas caviae (434) <input type="radio"/> Aeromonas hydrophila (47) <input type="radio"/> Aeromonas sp. (48) <input type="radio"/> Burkholderia sp. (133) <input type="radio"/> Citrobacter amalonitica (2) <input type="radio"/> Citrobacter freundii (16) <input type="radio"/> Citrobacter koseri (878)								<input type="radio"/> Citrobacter sp. (8) <input type="radio"/> Enterobacter aerogenes (8) <input type="radio"/> Enterobacter cloacae (8) <input type="radio"/> Enterobacter kobei (378) <input type="radio"/> Enterobacter sp. (10) <input type="radio"/> Escherichia coli (7) <input type="radio"/> Haemophilus (152) <input type="radio"/> Klebsiella aerogenes (5) <input type="radio"/> Klebsiella oxytoca (3) <input type="radio"/> Klebsiella pneumoniae (8) <input type="radio"/> Klebsiella sp. (157)								<input type="radio"/> Klebsiella variicola (1317) <input type="radio"/> Morganella morganii (78) <input type="radio"/> Pasteurea agglomerans (827) <input type="radio"/> Proteus hauseri (1351) <input type="radio"/> Proteus mirabilis (11) <input type="radio"/> Proteus penneri (400) <input type="radio"/> Proteus vulgaris (12) <input type="radio"/> Providencia rettgeri (13) <input type="radio"/> Providencia stuartii (14) <input type="radio"/> Pseudomonas sp. (238) <input type="radio"/> Pseudomonas aeruginosa (145)								<input type="radio"/> Pseudomonas putida (234) <input type="radio"/> Raoultella ornithinolytica (1058) <input type="radio"/> Salmonella sp. (212) <input type="radio"/> Serratia liquefaciens (217) <input type="radio"/> Serratia marcescens (18) <input type="radio"/> Streptococcus maltophilia (16) <input type="radio"/> Serratia odorifera (216)							
<input type="radio"/> Other <input type="text"/> (See page 3 for Code)																															
LABELS																															
TRANSPORT TUBE <input type="text" value="21-123456-01"/> <small>Org ID Code: _____ Lab Accession Number: _____</small>		TRANSPORT TUBE <input type="text" value="21-123456-01"/> <small>Org ID Code: _____ Lab Accession Number: _____</small>		TRANSPORT TUBE <input type="text" value="21-123456-01"/> <small>Org ID Code: _____ Lab Accession Number: _____</small>		TSB <input type="text" value="21-123456-01"/> <small>Org ID Code: _____ Lab Accession Number: _____</small>		TSB <input type="text" value="21-123456-01"/> <small>Org ID Code: _____ Lab Accession Number: _____</small>		TSB <input type="text" value="21-123456-01"/> <small>Org ID Code: _____ Lab Accession Number: _____</small>																					
2986	B4001	<small>Fill in circles correctly as it is shown</small> <input checked="" type="radio"/> Correct <input type="radio"/> Incorrect		1000458-1-1	33877																										
Project Number	Investigator Number	SMART_REQ_v1		Requisition Number																											

Anexo 3: Exemplo de um Requisition Form do ATLAS.



International Health Management Associates, Inc.
1100 Newer Drive
Ann Arbor, MI 48107
Tel: (734) 769-0000
Fax: (734) 769-0001

Requisition Form (REQ)
Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance
ATLAS

Submit results for pure culture only (one isolate per form)

Patient			Isolate Demographics					
Gender	Birth Year	Admission Date	Collection Date			IHMA Number		
		Day Month Year	Day Month Year	Day Month Year	Day Month Year			
<input type="radio"/> Female <input type="radio"/> Male	OR Age	<input type="radio"/> 01-17 <input type="radio"/> 02-18 <input type="radio"/> 03-18 <input type="radio"/> 04-21 <input type="radio"/> 05-21 <input type="radio"/> 06-22 <input type="radio"/> 07-23 <input type="radio"/> 08-24 <input type="radio"/> 09-28 <input type="radio"/> 10-28 <input type="radio"/> 11-27 <input type="radio"/> 12-28 <input type="radio"/> 01-28 <input type="radio"/> 02-28 <input type="radio"/> 03-31 <input type="radio"/> 04-28	<input type="radio"/> JAN <input type="radio"/> FEB <input type="radio"/> MAR <input type="radio"/> APR <input type="radio"/> MAY <input type="radio"/> JUN <input type="radio"/> JUL <input type="radio"/> AUG <input type="radio"/> SEP <input type="radio"/> OCT <input type="radio"/> NOV <input type="radio"/> DEC	<input type="radio"/> 2021 <input type="radio"/> 2022	<input type="radio"/> 01-17 <input type="radio"/> 02-18 <input type="radio"/> 03-18 <input type="radio"/> 04-21 <input type="radio"/> 05-21 <input type="radio"/> 06-22 <input type="radio"/> 07-23 <input type="radio"/> 08-24 <input type="radio"/> 09-28 <input type="radio"/> 10-28 <input type="radio"/> 11-27 <input type="radio"/> 12-28 <input type="radio"/> 01-28 <input type="radio"/> 02-28 <input type="radio"/> 03-31 <input type="radio"/> 04-28	<input type="radio"/> JAN <input type="radio"/> FEB <input type="radio"/> MAR <input type="radio"/> APR <input type="radio"/> MAY <input type="radio"/> JUN <input type="radio"/> JUL <input type="radio"/> AUG <input type="radio"/> SEP <input type="radio"/> OCT <input type="radio"/> NOV <input type="radio"/> DEC	<input type="radio"/> 2021 <input type="radio"/> 2022	Sample Number 21-000229
		Lab Accession Number						
Ward Type: <input type="radio"/> Emergency Room <input type="radio"/> Medicine-General <input type="radio"/> Surgery-General <input type="radio"/> Pediatric-General <input type="radio"/> Other <input type="radio"/> General Unpacified ICU <input type="radio"/> Medicine-ICU <input type="radio"/> Surgery-ICU <input type="radio"/> Pediatric-ICU <input type="radio"/> Unknown								
THIS SECTION MUST BE COMPLETED Source of Infection - Mark only one (1) choice								
SUPER-CURR	<input type="radio"/> Blood	<input type="radio"/> Abscess (IA) <input type="radio"/> Appendix <input type="radio"/> Colon <input type="radio"/> Diverticulum <input type="radio"/> Gall Bladder	<input type="radio"/> Liver <input type="radio"/> Pancreas <input type="radio"/> Peritoneal/Fluid <input type="radio"/> Small Intestine <input type="radio"/> Stomach <input type="radio"/> Other (IA)	<input type="radio"/> Urinary Tract <input type="radio"/> Kidneys <input type="radio"/> Prostate <input type="radio"/> Ureter <input type="radio"/> Urethra <input type="radio"/> Urinary Bladder <input type="radio"/> Uterus <input type="radio"/> Other UTI	<input type="radio"/> Skin & Skin Structures <input type="radio"/> Abscess (SS) <input type="radio"/> Dermis <input type="radio"/> Carbuncle <input type="radio"/> Cellulitis/Erysipelas <input type="radio"/> Decubitis <input type="radio"/> Other SS	<input type="radio"/> Lower Respiratory Tract <input type="radio"/> Lung Injury <input type="radio"/> Sepsis <input type="radio"/> Thoracostomy <input type="radio"/> Bronchial brushing <input type="radio"/> Endotracheal aspirate <input type="radio"/> Bronchoalveolar lavage (BAL)	SUPER-CURR	
Species Name - Mark only one (1) choice								
<input type="radio"/> Acinetobacter sp. (36)		<input type="radio"/> Proteus mirabilis (12)		<input type="radio"/> Staphylococcus aureus (21)		<input type="radio"/> Streptococcus pneumoniae (28)		
<input type="radio"/> Pseudomonas aeruginosa (15)		<input type="radio"/> Proteus mirabilis (11)		<input type="radio"/> Staphylococcus epidermidis (22)		<input type="radio"/> Sepsis-Hemolytic- <i>Streptococcus</i> (29)		
<input type="radio"/> Clostridium sp. (6)		<input type="radio"/> Genitalia micrococci (16)		<input type="radio"/> Staphylococcus haemolyticus (25)				
<input type="radio"/> Escherichia coli (7)		<input type="radio"/> Morganella morganii (10)		<input type="radio"/> Enterococcus faecalis (27)				
<input type="radio"/> Klebsiella sp. (15)		<input type="radio"/> Providencia sp. (7)		<input type="radio"/> Enterococcus faecium (2)				
<input type="radio"/> Enterobacter sp. (12)		<input type="radio"/> Haemophilus influenzae (14)		<input type="radio"/> Moraxella catarrhalis (22)				
LABELS								
TRANSPORT TUBE 21-000229-01 Org ID Code: Lab Accession Number:	TRANSPORT TUBE 21-000229-01 Org ID Code: Lab Accession Number:	TRANSPORT TUBE 21-000229-01 Org ID Code: Lab Accession Number:	TSB 21-000229-01 Org ID Code: Lab Accession Number:	TSB 21-000229-01 Org ID Code: Lab Accession Number:				
4747	88442	Fill in circles completely and as shown: <input checked="" type="radio"/> Correct <input type="radio"/> Incorrect		1000079-1-1	63502			
Project Number	Investigator Number	ATLAS_REQ_v1		Media Control				

Anexo 4: Exemplo de um formulário do SENTRY (categoria D).

Objective D Demo #: _____										2022 SENTRY Skin and Skin Structure Infections (ABSSSI) Site No. 138									
Date of Admission	Code No.	Accession No. (Local use only)	Organism Species	Date of Culture	Specimen Type *a	Sex (M/F)	Age	Service *b	ICU (Y/N)	Nosocomial (Y/N)									
	D-21																		
	D-22																		
	D-23																		
	D-24																		
	D-25																		
	D-26																		
	D-27																		
	D-28																		
	D-29																		
	D-30																		
	D-31																		
	D-32																		
	D-33																		
	D-34																		
	D-35																		
	D-36																		
	D-37																		