

**Estudo comparativo da atividade de aminoglicosídeos de  
origem natural e semissintética em  
*Enterobacteriaceae***

**Ângela Maria Pais Rodrigues**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de  
Produtos Naturais*

**Orientação Científica:**

Professora Doutora Helena Pimentel

Maria José Montanha

**Bragança, novembro de 2023**

*“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”.*  
- Isaac Newton (s.d.)

## **AGRADECIMENTOS**

Às professoras Helena Pimentel e Adília Fernandes pelos constantes incentivos para seguir em frente.

À minha família que sempre apoiou as minhas iniciativas, por mais difíceis que se apresentassem.

À minha mãe que, literalmente, me carregou até aqui.

À minha Tribo, um grupo de mulheres extraordinárias, que são um apoio incondicional.

À minha orientadora externa e grande amiga, Maria José Montanha, pela presença e persistência que me emprestou.

À ULSNE por incentivar e valorizar os seus profissionais nos respetivos trabalhos de investigação, como o presente.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABELAS .....	VI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
INTRODUÇÃO .....	1
<b>1. ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
1.2. OS ANTIBIÓTICOS.....	4
1.2.1 MECANISMO DE AÇÃO.....	7
1.2.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA.....	9
1.2.3 MULTIRRESISTÊNCIAS .....	13
<b>1.3. ENTEROBACTEREACEAES.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3. PROCEDIMENTOS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 PROCEDIMENTOS: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	20
3.2 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS (TSA) .....	25
3.3 DADOS .....	27
3.4 PROCEDIMENTOS ÉTICOS .....	27
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura e modelo molecular da Gentamicina e da Amicacina.....	6
<b>Figura 2:</b> Ação dos aminoglicosídeos na síntese de proteínas.....	7
<b>Figura 3:</b> Formas mais comuns de resistência das bactérias aos antibióticos.....	11
<b>Figura 4:</b> As relações evolutivas dos géneros e espécies de <i>Enterobactereaceas</i> com base em dados de sequenciação r-RNA de 16S.....	16
<b>Figura 5:</b> Tipos de sementeira de Gram Negativos, métodos usados no SPC-ULSNE.....	25
<b>Figura 6:</b> Mapa infográfico dos isolados de <i>Enterobactereaceas</i> estudadas.....	30

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Meios utilizados na cultura de isolados bacterianos G-.....	22
<b>Tabela 2:</b> Procedimento para obtenção de crescimento microbiológico.....	23
<b>Tabela 3:</b> Antibióticos e concentrações presentes no AST 355 de Gram Negativos....	27
<b>Tabela 4:</b> Caracterização dos utentes por sexo e intervalo de idades.....	31
<b>Tabela 5:</b> Caracterização da proveniência dos utentes.....	32
<b>Tabela 6:</b> Perfil das infeções dos utentes.....	33
<b>Tabela 7:</b> Caracterização por tipo de perfil repetição de infeções .....	33
<b>Tabela 8:</b> Análise da atividade dos antibióticos face aos processos de repetição de infeções.....	34
<b>Tabela 9:</b> Resumo da atividade dos antibióticos enquadrados em todas as variáveis...	35
<b>Tabela 10:</b> Prevalência das <i>Enterobactereaceae</i> isoladas. Relação da atividade dos antibióticos da atividade dos isolados com antibióticos.....	36

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATB: Antibiótico

DGS: Direção Geral de Saúde

ECDC: European Control Disease Center.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases).

Glintt<sup>®</sup>: Global Intelligent Technologies

G N: Gram Negativos

G P: Gram positivos

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

SPC: Serviço de Patologia Clínica

TSA: Testes de Sensibilidade aos Antibióticos

ULSNE: Unidade Local de Saúde do Nordeste

## RESUMO

O arsenal de antibióticos existentes está desatualizado. É imperioso encontrar novas formulações, melhorar as existentes e analisar padrões de resultados laboratoriais.

Os aminoglicosídeos, de ação bactericida, são usados em infecções por *Enterobactereaceae*. A utilização da Gentamicina, de origem natural, e da Amicacina, de origem semissintética, é limitada pelo efeito ototóxico e nefrotóxico.

As *Enterobactereaceae* são um problema grave: trata-se de uma família numerosa, que partilha plasmídeos, com capacidade de biofilme, existentes no bioma e oportunistas em colonização.

Pretendeu-se analisar a atividade da Amicacina e da Gentamicina em *Enterobactereaceae* de processos infecciosos de utentes da ULSNE, assim como verificar se há variação em situações recorrentes de infeção e em situações de multirresistência.

O presente estudo tem cariz retrospectivo, correlacional, assenta numa base de dados fornecida pela Glintt<sup>®</sup>, com os resultados de identificação de *Enterobactereaceae* e TSA para Gentamicina e Amicacina dos resultados dos utentes. Como marcador de multirresistência foram usados os Carbapenem.

Os dados são relativos a 10 242 processos de infeção de 7 395 pacientes com mais de 18 anos, com análises feitas no SPC-ULSNE, no período compreendido entre 2010 e 2022. Foi estudada a origem dos isolados, as características da população, a distribuição geográfica, a prevalência bacteriana e a atividade dos antibióticos.

Observou-se uma prevalência de infeções por *E. coli* (64,3 %), maioritariamente de infeções urinárias, sensíveis tanto à Amicacina (95,09%) como à Gentamicina (92,5%), e comportamento semelhante em Carbapenem (99,35%) como marcadores de resistência.

Observaram-se resistências a Gentamicina pelos géneros *Providencia* (81,10%), *Klebsiella* (28,40%), menos surpreendentes *Proteus* (19,30%) e *Morganella* (16,30%).

Conclui-se que estes são antibióticos com ação positiva sobre as *Enterobactereaceae*. No entanto, alguns géneros começam a demonstrar resistência à Gentamicina.

**Palavras-chave:** Amicacina, Gentamicina, *Enterobactereaceae*, Sensibilidade, Resistência, Infeção.

## ABSTRACT

The existing arsenal of antibiotics is outdated. It is imperative to find new formulations, improve existing ones and analyze patterns of laboratory results.

Aminoglycosides, with bactericidal action, are used in infections caused by Enterobacteriaceae. The use of gentamicin, of natural origin, and amikacin, of semi-synthetic origin, is limited by their ototoxic and nephrotoxic effects.

*Enterobactereaceae* are a serious problem: they are a large family, which shares plasmids, with biofilm capacity, existing in the biome, and opportunistic in colonization.

The aim was to analyze the activity of amikacin and gentamicin on *Enterobacteriaceae* from infectious processes in ULSNE users, as well as verifying whether there is variation in recurrent infection situations and multidrug resistance situations.

The present study is retrospective, correlational in nature, based on a database provided by Glintt®, with the identification results of Enterobactereaceae and TSA for Gentamicin and Amikacin from user results. Carbapenem was used as a multidrug resistance marker. The data relates to 10,242 infection processes from 7,395 patients over 18 years of age, with analyzes carried out at SPC-ULSNE, in the period between 2010 and 2022. The origin of the isolates, the characteristics of the population, the distribution geographical location, bacterial prevalence and antibiotic activity.

There was a prevalence of *E.coli* infections (64.3%), mostly urinary infections, sensitive to both Amikacin (95.09%) and Gentamicin (92.5%), and similar behavior with carbapenem (99.35%) as resistance markers. Resistance to gentamicin was observed in the genera *Providencia* (81.10%), *Klebsiella* (28.40%), and less surprisingly *Proteus* (19.30%) and *Morganella* (16.30%).

It is concluded that these are antibiotics with positive action on Enterobactereaceae. However, some genera are beginning to demonstrate resistance to Gentamicin.

**Key Words:** Amikacin, Gentamicin, *Enterobactereaceaes*, Sensitivity, Resistance, Infection

## INTRODUÇÃO

No atual cenário pós-pandémico, a atenção volta a cair, e com mais intensidade, numa dura realidade com surtos de bactérias capazes de resistir a todo o tipo de antibioterapia – podendo levar, em casos extremos, à morte de utentes com mais ou menos comorbilidades. Nos últimos 20 anos, tem-se vindo a assistir a um emergir de mutações bacterianas que condicionam o tratamento de utentes (Jones et al., 2017). Como tal, e de forma a detetar padrões, ou até encontrar novas soluções, a recolha de dados tem ganhado uma importância cada vez mais significativa, em especial no universo da Saúde - recorrendo ao leque extenso de ferramentas disponíveis para a investigação no século XXI (ONU, 2023).

Fazer o registo dos eventos relacionados com os antibióticos, a notificação da atividade dos mesmos, o registo do comportamento das bactérias e a relação de resposta individual do utente perante o microrganismo deveriam ser parte do desenho obrigatório da medicina moderna, a um nível global (OMS, 2023).

Dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2023) na newsletter de março de 2023, alertam para o aumento de resistência a antibióticos em infeções bacterianas. A recolha de dados abrange 87 países e o alerta estende-se a um aumento de resistências em infeções bacterianas fatais. Dentro do leque de infeções notificadas, há uma preocupação crescente com bactérias da ecologia hospitalar e da comunidade, que surgem como mediadores ou produtores dessas resistências, estendendo-se a medicamentos de última linha. Um exemplo disso é a *Escherichia coli* (*E. coli*), que apresenta resistência em cerca de 20% dos casos, assim como cepas de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *Acinetobacter spp* notificadas a nível global. Porém, estas percentagens não podem ser assumidas como um valor real, uma vez que existem muitos países que não apresentam qualquer notificação. Mais ainda, os países que notificam nem sempre o fazem de forma regular, contínua e universal. Ainda neste universo, 8% das infeções causadas por *K. pneumoniae* apresentam resistência aos Carbapenem, que são a última forma de tratamento de *Enterobacterales*, aumentando o risco de morte (ONU, 2022).

A realidade global é feita por pequenos grupos de informação. Este trabalho pretende comprovar o comportamento de dois aminoglicosídeos, mais especificamente a Gentamicina e a Amicacina, um de origem natural e outro semissintético, respetivamente, e verificar se estes dois antibióticos, pouco usados, apresentam um decréscimo da sua atividade em *enterobactereaceas*. São considerados de última linha uma vez que têm um efeito citotóxico importante e requerem uma monitorização muito apertada com doseamentos e medição dos efeitos subjacentes. Além disso, até ao momento, e apesar da baixa utilização, as bactérias também já lhes começam a oferecer resistência, especialmente quando usados em co-terapia (Ribeiro, 2017).

Para melhor compreender os padrões comportamentais dos antibióticos acima mencionados, este estudo assenta em bases de informação relativas aos resultados de todas as infeções estudadas na Unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE) no período compreendido entre 2010 e 2022, provocadas por *Enterobactereaceas*.

Recolheram-se todos os resultados relativos a isolados de infeções bacterianas de várias etiologias, de utentes de ambos os sexos com idade superior a 18 anos, provenientes de todo o distrito, obtendo assim um maior leque de respostas. Nos isolados foi testada a atividade da Gentamicina e da Amicacina; como forma de caracterização de resistência recolheram-se dados relativos a atividade dos Carbapenem (Ertapeneme, Meropeneme e Imipeneme). Estes dados foram tratados de forma a obter o comportamento dos dois antibióticos nas várias *Enterobactereaceas* identificadas - *E coli*; *K. pneumonia*; *Stennotrophomonas spp*; *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*; *P. mirabilis*, num total de 10 242 isolados bacterianos e mesmo número de infeções, pertencentes a 7 935 utentes.

Com estes dados pretende-se, de uma forma global, analisar a atividade da Gentamicina e da Amicacina face às *Enterobactereaceas* isoladas.

Como objetivo secundário, pretende-se ainda avaliar a ação da Gentamicina e da Amicacina em utentes com reincidências infecciosas onde foram isoladas a mesma família bacteriana.

Finalmente, e dado o universo estudado, tem-se como último objetivo avaliar a atividade dos mesmos antibióticos em *Enterobactereaceas* multirresistentes, considerando os Carbapenem como marcador de resistência (EUCAST, 2017).

Para melhor compreensão do trabalho, num primeiro capítulo, introduzem-se conceitos teóricos relacionados com antibióticos, especificamente aminoglicosídeos, especificamente a Gentamicina, antibiótico de secreção natural pela bactéria *Micromonaspora purpurea* e a Amicacina sintetizada a partir da Canamicina. Ambos têm capacidade bactericida, o mesmo mecanismo de ação e com os mesmos mecanismos de resistência. Dos Gram Negativos são apresentadas as *Enterobactereaceae* dando ênfase às identificadas na ecologia hospitalar da ULSNE.

Descreve-se o tratamento dos vários produtos para a obtenção dos isolados bacterianos que nos permitem conseguir as identificações dos géneros estudados e o teste de sensibilidade aos antibióticos, a metodologia em que assentam e a interpretação do efeito destes na atividade de *Enterobactereaceae* como a *E. coli* ou *K. pneumonia*.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente para avaliar as hipóteses estabelecidas e foram aplicados *odds ratio* para avaliação do risco de aparecimento de resistências. Seguidamente, apresentam-se os resultados obtidos a partir dos 10 242 isolados bacterianos, o estudo feito e as respostas obtidas sobre a atividade da Gentamicina e da Amicacina sobre as *Enterobactereaceae* obtidas a partir de isolados bacterianos na população da ULSNE, um total de 7 395 utentes. Dos 10 242 isolados de utentes concluiu-se que, no universo estudado, a atividade dos antibióticos analisados é significativa - verifica-se um padrão médio superior a 80% de atividade. Não há uma relação direta entre o desenvolvimento de resistências e a idade, origem dos produtos ou a proveniência; no entanto, pode apurar-se que, comparando faixas etárias, há risco mais elevado de se virem a desenvolver resistências nas faixas etárias superiores a 66 anos.

## **1. ENQUADRAMENTO TEÓRICO**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a resistência aos antibióticos “ocorre quando as bactérias se alteram em resposta ao uso de antibióticos utilizados para tratar infecções bacterianas, tornando-os ineficazes” (OMS, 2022). Nesse sentido, a maior preocupação da comunidade científica é o desenvolvimento de resistência bacteriana, sobretudo a nível hospitalar, constituindo um grave problema de saúde pública (Khan, 2017).

Muito se tem investido no conhecimento das bases bioquímicas e dos vários mecanismos de resistência, com o objetivo de implementar melhores políticas de antibioterapias para reduzir o surgimento e disseminação de resistências. Por outro lado, é importante procurar novas abordagens terapêuticas que contemplem organismos resistentes a múltiplos fármacos (Munita, 2016).

Segundo Christopher Murray, coautor do estudo e diretor do Instituto de Métricas e Avaliação da Saúde (IHME) da Universidade de Washington, em 2019 as infecções bacterianas foram a segunda causa de morte direta e em associação (HIV, Neoplasias...) no mundo perfazendo 7,7 milhões de mortes em 204 países com notificação, pelo que estes números poderão ser mais elevados (Murray, 2019).

Junto das populações fazem-se campanhas de sensibilização contra o uso inadequado de antibióticos. Ao visitar a página da Direção Geral de Saúde (DGS, 2017), podemos verificar que existe toda uma engrenagem que envolve a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Centro de Controlo de Doenças da Europa (CDCE) e da própria Direção Geral de saúde (DGS), no sentido de aumentar a literacia sobre os antibióticos, sobre o poder que tem o simples ato de lavar as mãos, no sentido de ganhar uma guerra de saúde pública contra as bactérias, que sem fim à vista estamos nitidamente a perder.

### **1.2. OS ANTIBIÓTICOS**

O termo antibiótico foi atribuído a Selman Wakman em 1942, que o definiu como sendo “um composto natural produzido por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano ou têm um efeito microbicida” (Sousa, 2016).

Naturalmente, estas substâncias são produzidas por espécies de microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos) como forma de inibir o crescimento de outros microrganismos. O Homem aprendeu a extrair naturalmente essas substâncias e, com o passar do tempo, da evolução da Medicina e da investigação farmacêutica têm-se acrescentado um número crescente de moléculas semissintéticas e semissintéticas, denominados por alguns autores como quimioterápicos (Brunton, 2006).

A descoberta dos antibióticos, em 1928, não previa o que se iria desenrolar com a descoberta da penicilina e a presente luta para controlar o seu uso. Desde aquela data, são sem dúvida os medicamentos mais receitados com exame laboratorial ou empiricamente (Burton, 2006).

Os antibióticos constituem um grupo heterogéneo com comportamento diverso, tanto na farmacocinética como na farmacodinâmica, exercendo uma ação específica sobre as estruturas e/ou funções do microrganismo. Têm elevada potência biológica a baixas concentrações e toxicidade seletiva – sendo esta última mínima para as células do organismo do hospedeiro (Yao, 2011).

Um grupo tão heterogéneo de substâncias químicas pode ser classificado de diversas formas:

- Segundo o espectro de ação - neste grupo existem dois tipos, um espectro amplo, que engloba aqueles antibióticos que são ativos sobre um grande número de espécies e géneros diferentes, e um espectro reduzido, quando exercem a sua atividade num reduzido número de espécies.
- Segundo o mecanismo de ação – nesta forma de agrupamento é considerado o mecanismo que o antibiótico usa para inibir o crescimento ou destruir a célula bacteriana. Este grupo pode ser subdividido em inibidores da formação da parede bacteriana, inibidores da síntese proteica, inibidores da duplicação do ADN, inibidores da membrana citoplasmática e inibidores das vias metabólicas.
- Segundo a farmacocinética e a farmacodinâmica – para este enquadramento, na separação de grupos, observa-se a absorção, distribuição e eliminação na farmacocinética; já para a farmacodinâmica observa-se a característica e a relação entre o medicamento e os seus efeitos desejáveis e indesejáveis (Goodman et al., 2012).

- A forma de agrupamento dos antibióticos mais utilizada é por estrutura: aminoglicosídeos, Carbapenem, cefalosporinas (várias gerações), glicopeptídeos, macrólidos, monobactames, penicilinas, polipeptídicos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e lincosamidas. Estes fazem parte do protocolo de estudo do Serviço de Patologia Clínica (SPC) da ULSNE (Alves, 2019).

Os aminoglicosídeos pertencem a uma classe de antibióticos antigos em termos de descoberta. A primeira molécula, obtida em 1944, foi a estreptomicina. Esta descoberta feita a partir do *Streptomyces griseus*, teve o objetivo de combater o *Micobacterium tuberculosis*. Foram descobertas outras moléculas, umas a partir de culturas e outras semissintéticas (Ribeiro, 2017).

Os antibióticos deste grupo têm origem natural, obtidos de culturas do género *Streptomyces*: a estreptomicina, neomicina e canamicina; ou de culturas do género *Micromonospora*: Gentamicina e netilmicina. Já outras formulações semissintéticas deste grupo são obtidas pela adição de novos radicais com objetivo de aumentar a sua eficácia e diminuir os efeitos tóxicos (Sousa, 2016).

Este grupo de antibióticos possuem um anel aminociclitol, derivado do inositol. Está unido a um ou mais açúcares aaminados por ligações glicosídicas, derivando a designação para aminoglicosídeo-aminociclitol. Esta estrutura confere-lhes propriedades hidrossolúveis mais ativas em pH alcalinos (Sousa, 2016).

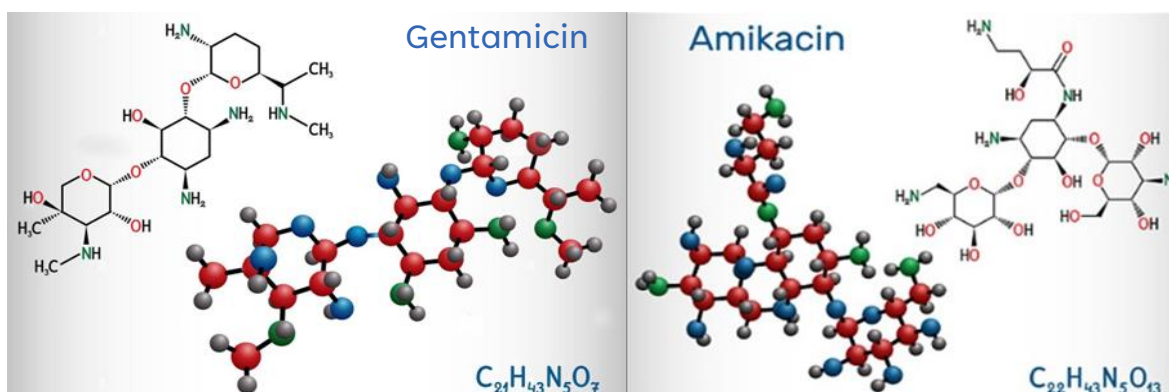


Figura 1: Estrutura e modelo molecular da Gentamicina, imagem da esquerda e da Amicacina, imagem da direita. Adaptado Liliya / Alamy Vector (2021).

### 1.2.1 MECANISMO DE AÇÃO

Os aminoglicosídeos são antibióticos que exercem a sua atividade contra bacilos Gram Negativos, muitos *Staphylococcus*, micobactérias e alguns *Streptococcus* (Goodman, et al, 2011). O seu mecanismo de ação é bactericida, totalmente dependente da concentração – isto é, quanto maior a concentração no utente, maior é a sua eficácia. Estes medicamentos são, normalmente, administrados por via endovenosa, sendo também por esta razão de uso hospitalar. A sua depuração e excreção é feita através dos rins ao fim de 2 a 3 horas (Chambers, 2010). As moléculas não usadas são recuperados na urina sem perda de propriedades. Atualmente é uma das preocupações do mundo, o impacto ambiental da excreção e rejeição deste tipo de substâncias (Ribeiro, 2020).

Quimicamente, os aminoglicosídeos possuem açúcares hidrofílicos com variados grupos amino, protonados a pH fisiológico. Esta característica permite-lhes funcionar como moléculas policationicas que facilitam a ligação às regiões polianiónicas de rRNA 16S na subunidade 30S ribossomial (Sousa, 2016).

Como se pode observar na figura 2, o antibiótico liga-se à subunidade ribossómica 30S impedindo a correta ligação da subunidade 50S ocorrendo um bloqueio da formação do complexo de iniciação. (B) Erro na transcrição do RNAm dando-se a interrupção prematura da tradução. (C) Incorporação de aminoácidos incorretos originando proteínas anormais que não funcionam ou funcionam mal.

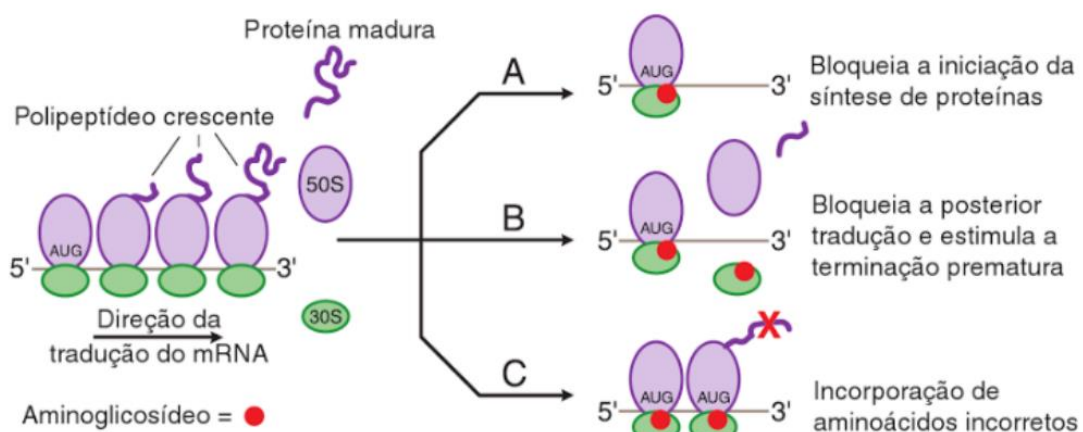


Figura 2: Ação dos aminoglicosídeos na síntese de proteínas. (Adaptado de MacDougall&Chambers, 2012).

Os mecanismos de ação dos aminoglicosídeos, apesar de muito estudados, continuam a parecer bastante complexos e há ainda muito espaço para estudo. No caso das bactérias Gram negativas, sabe-se que passam a membrana externa através de um processo de “self-promoted” por competição com íons de  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ , pois estas formam naturalmente pontes estabilizadoras entre as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS). A capacidade de o aminoglicosídeo desorganizar a estrutura da parede celular torna a bactéria mais permeável - ocorre a autopromoção da difusão para o interior da bactéria (Sousa, 2016). No que toca à membrana citoplasmática, dada a natureza policationica dos aminoglicosídeos (previamente referida) e as suas características polares, obrigam à passagem por transporte ativo. Ocorre, portanto, uma mobilização de energia metabólica (produzida durante a respiração bacteriana) nas reações de oxidação-redução que ocorrem na cadeia respiratória. Esta característica justifica a resistência constitutiva dos anaeróbios aos aminoglicosídeos. Assim, a difusão dos aminoglicosídeos para o interior da bactéria é dependente de transporte de eletrões e do potencial elétrico da membrana citoplasmática da bactéria (Sousa, 2016).

A difusão dos aminoglicosídeos através da membrana citoplasmática tem duas fases que dependem de energia; a fase dependente de energia I (EDP-I) e a fase dependente de energia II (EDP-II). A fase I tem um decurso lento e complexo, pelo que pode ser bloqueada ou inibida por catiões divalentes em situações de baixo pH, hiperosmolaridade, condições de anaerobiose e com inibidores da cadeia respiratória como os cianetos (Mingeot, 1999; Kapoor, 2017). Por sua vez, a fase II é anulada aumentando a concentração dos aminoglicosídeos  $\geq 30\mu\text{g/ml}$ . Esta fase permite que uma pequena quantidade de antibiótico atravesse a membrana citoplasmática (Sousa, 2006).

Depois de aceder ao citoplasma, as moléculas de aminoglicosídeos vão estabelecer ligações químicas com a subunidade 30S do ribossoma. Após o estabelecimento da ligação podem ocorrer duas situações:

- a produção de proteínas anormais que, ao integrar-se na membrana citoplasmática da bactéria vão alterar a permeabilidade da membrana;
- o bloqueio da síntese proteica no ribossoma, que impede o crescimento celular, evidenciando o efeito bactericida dos aminoglicosídeos (Kapoor, 2017).

A regra de ouro para a prescrição de antibióticos é escolher primeiro os antibióticos eficazes de menor espectro de atividade possível, fugir à prescrição empírica é a melhor opção. Esta corrente adota uma atitude restritiva relativamente aos vários grupos de

antibióticos com eficácia, resumindo a um ou dois fármacos de cada grupo (DGS, 2023). Por essa razão, os aminoglicosídeos não são recomendados em monoterapia nas infecções graves - isto é, devido à possibilidade de um único antibiótico poder não cobrir por completo a atividade das bactérias envolvidas (Tamma, 2012).

Ainda que o custo de muitos aminoglicosídeos seja baixo em comparação com outros agentes antibacterianos, houve um declínio do seu uso nos últimos dez anos, principalmente devido ao aumento das resistências bacterianas a estes antibióticos, bem como devido à toxicidade associada à sua utilização. Todavia, publicações recentes sugerem que a sua utilização está novamente a aumentar devido ao aparecimento de resistências a outros antibacterianos disponíveis, particularmente em bactérias de Gram Negativo (Legget, 2017).

Outra das razões para o seu uso crescente é que são muitas vezes indispensáveis para o tratamento de infecções várias assim como profiláticos em situações especiais. Dentro das características que os tornam elegíveis salientamos a atividade bactericida dose-dependente, o efeito pós-antibiótico, uma farmacocinética relativamente previsível e um efeito sinérgico com outros antibióticos (Vacutechento, 2017).

A resistência natural aos aminoglicosídeos é a apresentada pelas bactérias anaeróbias, uma vez que estes antibióticos usam a cadeia de transporte de elétrons para poder entrar na bactéria sendo este o mecanismo principal de resistência natural aos aminoglicosídeos (Leggett, 2017).

### **1.2.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA**

Aos mecanismos de resistência adquirida dedica-se muito estudo, considerando-se neste momento três mecanismos fundamentais:

- A modificação/inativação enzimática é a causa apontada para o rápido aumento de resistências é a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMA), como as: fosfotransferases, nucleotidiltransferases e acetiltransferases encontradas em Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae* (Kapoor, 2017). Estas enzimas têm a capacidade de induzir alterações estruturais nos aminoglicosídeos, reduzindo a afinidade da molécula do antibiótico modificada à subunidade 30S do ribossoma. Desta forma, a bactéria assegura a síntese proteica (Strateva, 2009).

- Diminuição da permeabilidade da membrana externa é dos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos mais vistos nas bactérias e consiste na alteração da membrana externa, diminuindo o número de canais de porina. Esta diminuição interfere com a permeabilidade da membrana, limitando a quantidade de antibiótico que atinge o interior do microrganismo (Strateva, 2009).
- Existe também a redução da acumulação intracelular devido ao efluxo ativo. Algumas espécies bacterianas têm resistência a um antibiótico, explicável pela sobre expressão de genes que codificam as bombas efluxo. Podem estar localizados em elementos genéticos móveis ou no cromossoma da célula bacteriana. Não é um mecanismo tão frequente, mas tem significado nas resistências (Baptista, 2013). Nas bactérias Gram negativas encontra-se pelo menos um transportador de fluxo de múltiplos fármacos; este é responsável pelo surgimento de resistências, uma vez que protege a bactéria contra alguns agentes antibióticos (Pagés 2009).

As formas de resistência aos aminoglicosídeos identificadas estão relacionadas com a produção de enzimas (aminoglicolases), ponto 2 da figura 3, a bomba de efluxo, ponto 5, e alteração do ponto alvo de entrada ponto 1.

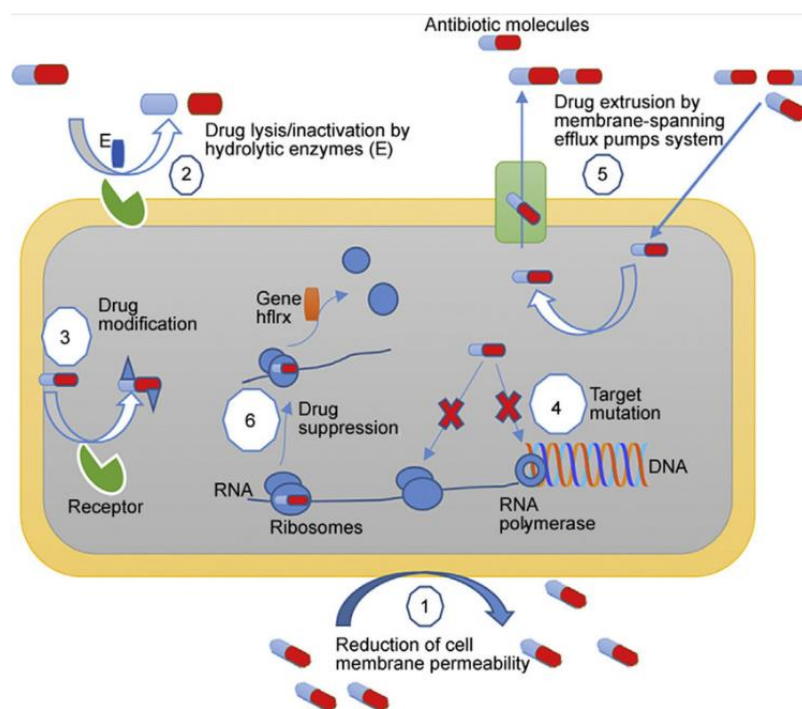


Figura. 3: Formas mais comuns de resistência das bactérias aos antibióticos. Adaptado de recheer gate.net

A Gentamicina é um aminoglicosídeo, isolado a partir da Bactéria *Micromonospora purpúrea* por processos fermentativos. Apresenta atividade tanto em Gram positivos como em Gram Negativos, mas é utilizada maioritariamente no tratamento de *Enterobactereaceas* Gram negativas. É utilizada no tratamento de infeções ósseas, endocardites, doença inflamatória pélvica, meningite, pneumonia, infeções do trato urinário, sepse e ainda infeções por gonorreia e clamídia ([INDICE.eu](http://INDICE.eu) - Toda a Saúde). Constitui uma família onde estão incluídas as Gentamicinas C1, C1a e C2, a sisomicina e a netilmicina. Estes grupos têm um aminoaçúcar específico - a garosamina -, e uma 3-aminopentose na posição III. Apesar de poder sofrer metilação no aminoaçúcar em I, que dá origem a vários tipos de Gentamicina, não se observam modificações que alterem a sua atividade biológica. Também está referenciada a incompatibilidade química, *in vitro* com  $\beta$ lactâmicos, por mecanismo de abertura nucleofílico do anel  $\beta$ lactâmico, inativando-o. O anel, por sua vez, reage com o grupo metilamino da Gentamicina dando lugar a uma amina sem atividade farmacológica. Esta situação, observada *in vitro*, só tem interesse clínico se for em utentes com disfunção renal em que a excreção é retardada (Sousa, 2016).

O mecanismo de ação da Gentamicina é o já descrito para os aminoglicosídeos - exerce a sua função direta e irreversivelmente nas proteínas 30S do ribossoma. Ademais, a Gentamicina apresenta características como a ação degradativa das enzimas bacterianas APH (3'), APH (3''), AAD (6), AAD (3''), AAD (9), AAC (3) III e AAC (6'') e suscetibilidade as enzimas APH (2''), AAC (3) -I, AAC (3) III e AAC (2'), sendo este facto uma condicionante para a atividade bacteriana (Murray, 2006). Tem um espectro largo, pode exercer a sua atividade contra os *S. Aureus* e bacilos Gram Negativos, incluindo a *P. aeruginosa*. Apresenta atividade moderada contra o *Streptococcus* spp. e sinergicamente com penicilina apresenta bons resultados contra *E. faecalis* e *E. faecium* (Murray, 2006).

A Gentamicina não é absorvida no trato gastrointestinal, já que a sua utilização terapêutica é por via intramuscular e intravenosa. A administração Intra-gástrica de lipossomas contendo Gentamicina é uma forma de absorção oral, com obtenção de concentrações séricas razoáveis. O pico máximo (4 $\mu$ g/mL) atinge-se entre 1,5h e 2h após a sua administração de 1mg/Kg em adultos (Infarmed, 2023)

No que à toxicidade concerne, a Gentamicina é eliminada por via renal, via filtração glomerular, atingindo elevadas concentrações urinárias. A clearance de Gentamicina está diretamente relacionada com a clearance de creatinina, devendo a dosagem ser ajustada através destes valores analíticos, no sentido de evitar uma excessiva acumulação sanguínea. Quando em excesso, deve ser removida por hemodiálise e por diálise peritoneal (Sousa, 2016).

A Gentamicina é mais nefrotóxica que os outros aminoglicosídeos porque é absorvida nas células tubulares - estando associada à necrose aguda principalmente do tubo proximal. Como todos os aminoglicosídeos tende a acumular-se nos fluídos do ouvido interno, revelando os seus efeitos ototóxicos. Esta reação é irreversível e pode aparecer sob a forma de lesão vestibular e/ou coclear (Tavares, 2005).

Da mesma forma que os restantes aminoglicosídeos, quando administrada em doses muito elevadas e durante tratamentos prolongados pode causar bloqueios neuromusculares do tipo não despolarizante, podendo conduzir a paragens respiratórias (Tavares, 2005).

A Amicacina é um antibiótico semissintético derivado da canamicina (é um complexo antibiótico produzido por *Streptomyces kanamyceticus*). Como os outros aminoglicosídeos deste grupo, tem função bactericida. É produzida por acilação da molécula de canamicina A e exibe em C1 do anel aminociclitol (2- dexoxiestreptamina) uma cadeia lateral 2-hidroxi-4-aminobutirilo. É dos aminoglicosídeos o que apresenta maior espectro, por não sofrer inativação pelas enzimas que inativam os demais aminoglicosídeos (Sousa, 2016).

Falando de mecanismos de ação da Amicacina, esta oferece maior estabilidade contra a maioria das enzimas inativadoras das moléculas - exceto contra a AAC (6'), produzida pelos microrganismos Gram Negativo, e contra APH (3'), produzida por estirpes de *S. aureus*. Atua fundamentalmente sobre bactérias Gram Negativo e, para atingir o local de ação, atravessa a membrana externa das bactérias, por difusão, através das porinas, e atravessa a membrana citoplasmática. Seguidamente, une-se à subunidade 30S dos ribossomas induzindo uma leitura errônea do código genético das proteínas.

A Amicacina é uma molécula de grande dimensão como outros aminoglicosídeos. Também está carregada positivamente e, por estas razões, a nível GI, não é absorvida. É absorvida com rapidez, logo após a administração intramuscular, e aproximadamente 91% é excretada sem modificação por via urinária, em casos de função renal normal. A

sua semivida de eliminação é de 2 horas e o controlo de absorção é feito no plasma. É aplicada no tratamento de infeções por *S. aureus* e bactérias Gram-negativo incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus* indol-positivos e indol-negativos, *Providencia* sp., *Klebsiella*, *Enterobacter spp*, *Serratia* spp. e *Acinetobacter spp*. (Índice terapêutico) (Sousa,2016).

A toxicidade da Amicacina, em fase aguda, é diferente da Gentamicina. Existem estudos que provam as suas capacidades ototóxicas, com características de irreversibilidade em tratamentos prolongados, que é a característica mais limitada da sua utilização em terapêutica generalizada. À semelhança da Gentamicina a da Amicacina, apresenta toxicidade vestibular, mas é mais toxico-coclear (torna-se essencial o controlo audiométrico durante estes tratamentos (Kapoor,2017).

### 1.2.3 MULTIRRESISTÊNCIAS

Os tratamentos de infeções exigem a identificação e o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) para poder direcionar a terapia e reduzir o fracasso dos tratamentos. A redução da efetividade dos tratamentos deve-se, em parte, à adequação e à escolha da droga e à concentração a aplicar. Esta decisão, se mal feita, leva à sobrevivência de populações bacterianas e à indução de mecanismos de resistência (Ribeiro, 2011).

Em 2012, o European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) publicou um consenso para o que é a multirresistência bacteriana, sendo considerado multirresistente aquele que não é sensível a pelo menos um antibiótico de 3 grupos; somam-se ainda as categorias de extensivamente resistente quando não é sensível a dois antibióticos de todos os grupos e panresistente quando não é sensível a todos os antibióticos de todas os grupos (Magiorakos, 2012).

Já em 2008, Louis B. Rice, um académico de Oxford, utilizou o acrónimo ESKAPE para definir as, denominadas na comunicação social, super-bactérias: *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*. Mais tarde considerou-se importante inserir outro E para incluir a E. Coli, ficando definitivamente ESKAPEE. Estas são as bactérias cuja atividade é mais importante de monitorizar (Rice, 2018).

As bactérias Gram Negativas são relativamente mais resistentes do que as Gram Positivas devido ao facto de a sua parede celular possuir porinas. A atuação destas proteínas da

parede consiste em bloquear a entrada de moléculas no meio intracelular tornando a antibiótico ineficaz na sua ação (Rice, 2018)

No grupo de antibióticos a considerar são os  $\beta$  lactâmico e espectro alargado (ESBLs), e os Carbapenem, tendo sido adicionada recentemente a colistina, aos antibióticos obrigatórios de estudo (Alves, 2019).

### **1.3. ENTEROBACTEREACEAES**

A família *Enterobacteriaceae* é das famílias de bactérias, uma das mais importantes com significado clínico. Fazem parte deste grupo de bactérias como a *Yersinia pestis*, ou a *Salmonella typhi* (serotipo *Typhi*) com marca na história da humanidade. Também estão incluídas nesta família os géneros *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia* e *Salmonella* como agentes entéricos causadores de infeções; embora só alguns serotipos sejam virulentos, têm, no entanto, a capacidade de colonizar e produzir enterotoxinas (Murata, 2001). Várias espécies de *Enterobacteriaceae* têm capacidade de causar infeções extraintestinais e demonstram ser oportunistas, hospedeiros ideais de instituições prestadoras de cuidados de saúde (Murata, 2001).

A nomenclatura e classificação do género, espécie, subespécie, biogrupo e serotipos de *Enterobacteriaceae* estão em constante reavaliação. Nesse sentido, obviamente que a literatura contém muitas opiniões diferentes (Brenner e Farmer 2005). A evolução dos últimos anos, com métodos como a hibridização do ADN-ADN e sequenciação r-RNA 16S (Fox et al. 1992), permitem medir a distância evolucionária da *Enterobacteriaceae*. Se avaliarmos géneros e espécies na família podemos ver uma relação mais próxima com a *Escherichia coli* (Fig. 4).

A utilização da hibridização do ADN-ADN expandiu muito o número de espécies na família e levou a uma compreensão básica da relação filogenética entre géneros e espécies. Por outro lado, a sequenciação do 16S rRNA tem sido muito útil na definição de relações filogenéticas ao nível do género e família (Brenner e Farmer, 2005).

O número de géneros e espécies na família aumentaram dramaticamente, especialmente nas últimas quatro décadas. De exemplo serve o facto de que havia 12 géneros e 36 espécies em 1974, quando foi publicado a oitava edição do Manual de Bacteriologia Determinante de Bergey (Buchanan e Gibbons, 1974), aumentando para 30 géneros e 107



principais agentes de infecções urinárias e de bacteriémicas. Em ambas as infecções destacam-se, a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Patel et al., 2010).

A *E. coli* é o agente mais frequentemente encontrado nas infecções do trato urinário e é responsável por cerca de 90% das primeiras infecções urinárias. Além das infecções do trato urinário, é responsável por gastroenterites, pneumonias, entre outras. Dada a importância e papel que representa no universo das infecções, tem a uma menção diferenciada nas informações destinadas à população geral na página da ECDC desde 2008. A complexidade dos quadros infecciosos que apresentam grande morbidade e elevadas taxas de mortalidade agrava, tendo em conta o grau elevado de resistências aos principais antibióticos com que são tratados:  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos-aminociclitois (Baylis, 2005). A sua atividade infecciosa entérica levou a que se criassem os acrónimos que se enumeram a seguir:

- EPEC: correspondente à *Escherichia* enteropatogénica, vulgarmente associada à diarreia do recém-nascido. Consegue aderir à membrana citoplasmática do enterócito, ocorrendo a fusão das vilosidades da bordadura em escova e formando-se uma aderência íntima entre a bactéria e a membrana do enterócito. Na parte inferior da bactéria forma-se um pedestal de filamentos de actina polimerizada específico destas estirpes.
- ETEC: *Escherichia* enterotoxígenas. Trata-se de estirpes produtoras de dois tipos de toxinas - as termo-lábil (LT) e as termo-estável (TL). A toxina LT provoca um aumento intracelular de cAMP no enterócito, surgindo um distúrbio da permeabilidade da membrana citoplasmática. Este comportamento pode ser visto na toxina de *V. cholerae*. As fimbrias (CFA/I e CFA/II) destas estirpes acionam a aderência à bordadura em escova, o 1º estágio da infecção entérica nos humanos, seguindo-se a libertação das enterotoxinas.
- EHEC: *E.coli* enterohemorrágica. São estirpes produtoras de uma verotoxina (de efeitos patológicos em células Vero). Os efeitos provocados são semelhantes aos que a toxina de *Shigella dysenteriae* causa, levando a colites hemorrágicas, diarreias não sanguinolentas e síndrome hemolítico-urémico.
- EIEC: *E. coli* ENTER invasiva. Este tipo de *E. coli* causa disenteria bacilar, uma infecção ulcerativa no intestino grosso. Invade as células e

causa diarreia aquosa à base de sangue. Nos casos mais severos, pode danificar a mucosa, ao invadir as células do epitélio causa ulcerações no intestino (Baylis, 2005).

- EAEC: *E. coli* enteroagregativa. Foi descrita pela primeira vez no fim de século XX, tendo ficado associada à diarreia persistente, em crianças de áreas endêmicas, a indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida e como causa de diarreia em viajantes. Em algumas regiões, a EAEC ultrapassa a *E. coli* enterotoxigenica (ETEC) como o patógeno mais comum identificado em amostras de fezes diarreicas. Nos Estados Unidos começa a ser considerado um patógeno emergente, reconhecido como a principal causa de diarreias em adultos e crianças saudáveis, tendo como causa principal comida contaminada (Cohen, 2005).

A *E. coli* é o principal agente etiológico das infecções urinárias. É a aderência da bactéria ao uroepitélio que origina a primeira etapa da sequência da infecção urinária. Dependendo das características das estirpes, podem invadir o trato urinário baixo, alto ou ambos, ainda que se verifique ausência de obstrução ou procedimentos invasivos – cirúrgicos. Nas estirpes uropatogénicas as fímbrias bacterianas desempenham um papel importante no processo de aderência. Nestas estirpes predominam as fímbrias do tipo 1, fímbrias P e adesinas X (Brooks, 2014).

Também utiliza transposons na codificação de processos de resistência - o Tn5, que confere resistência à neomicina e à canamicina, e o Tn10, que confere resistência à tetraciclina (Brooks, 2014).

Outro fator importante a considerar na monitorização do comportamento da *E. coli* é esta ser a bactéria eleita por excelência para todo o tipo de estudos genéticos, de produção alimentar e outros devido a versatilidade e adaptabilidade quer se trate de vitro ou vivo (Zimmer, 2012).

A importância da medicação com conhecimento do agente advém de a possibilidade das infecções do trato urinário poderem resultar em bacteriémias com sinais clínicos de sépsis. (Brooks, 2014)

A *Klebsiella spp.* foi assim designada por Edwin Klebs, um microbiologista alemão. É um bacilo não flagelado, sem mobilidade, Gram Negativo e possui uma cápsula de polissacáridos proeminente. A cápsula encerra toda a superfície celular; explica a grande

aparência do organismo na mancha de Gram, e fornece resistência contra muitos mecanismos de defesa do hospedeiro e contra antibioterapia.

Os membros de género *Klebsiella* expressam tipicamente 2 tipos de antígenos na superfície celular: “O” e “K”. Dos últimos, conhecem-se 72 polissacarídeos diferentes que formam outros tantos tipos serológicos (77 antígenos K). A variabilidade estrutural destes antígenos formam a base para a classificação em vários serotipos.

Os fatores de patogenicidade deste género são: 1) a cápsula, que é um fator antifagocitário e 2) a endotoxina da parede é um polissacarídeo. Tem a capacidade de infetar diversos tecidos, embora as infeções mais significativas sejam as respiratórias.

Três espécies do género *Klebsiella* estão associadas com doenças no ser humano: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxycota* e *Klebsiella granulomatis*. As *Klebsiella ozaenae* e *Klebsiella rhinoscleromatis* são consideradas formas *K pneumoniae* não fermentativas com manifestações clínicas (Brooks,2014).

Culturalmente, caracteriza-se por fermentar a lactose - produz colónias muito mucoides em meio de cultura, devido à produção da cápsula polissacarídea. Nos últimos anos, as *Klebsiella* desenvolveram um papel importante nas Infeções associadas aos cuidados de saúde (Alves, 2019).

A ecologia bacteriana hospitalar é desde sempre muito variada. Em 2018, a dissertante fazia parte do grupo de recolha e tratamento de dados da então Comissão de Controlo de Infeção (CCI) da ULSNE. Os relatórios contemplavam a ecologia hospitalar e eram emitidos de 3 em 3 meses. No relatório final do ano 2018 verificou-se na ecologia hospitalar um 32% de presença de *E. coli* com 15,3% e *K. pneumoniae* com 3,82%, com menor significado *Enterobacter* spp. (1,75%), entre outras bactérias como *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. Observaram-se também resistências interessantes aos Cefalotina/Cefaloxina, do grupo de bactérias registadas (Pombo,2018).

## **2. OBJETIVOS**

Tendo isso em consideração universo estudado, este trabalho propõe-se a comparar a atividade de dois antibióticos aminoglicosídeos: a Gentamicina (extraído da *Micromonospora purpúrea*) de secreção natural, e a Amicacina (obtida a partir da canamicina que, por sua vez, é obtida do *Streptomyces kanameticus*), em isolados bacterianos de *Enterobactereaceae*s, obtidos entre os anos de 2010 e 2022. Procura-se

avaliar comparativamente a atividade de ambos antibióticos em isolados oriundos de uma variedade de produtos, por sua vez provenientes de utentes de cuidados primários e de cuidados hospitalares tanto de internamento, como de hospital de dia ou consulta hospitalar. Desta forma pretende-se um maior leque de isolados de forma a verificar se existe, de facto, diferença entre um e outro.

Dado o espaço temporal dos dados, é oportuno e propositado analisar ainda a atividade dos mesmo antibióticos em reincidência de infeções por *Enterobactereaceaes* ao longo do tempo – assumindo-se este como um objetivo secundário.

Finalmente, usando como marcadores de multirresistência o Carbapenem (Meropenem, Imipenem e Ertapenem), conforme identificados pelas últimas diretrizes da EUCAST é premissa deste trabalho analisar a atividade dos dois aminoglicosídeos na presença de multirresistências.

### **3. PROCEDIMENTOS E MÉTODOS**

O estudo é retrospectivo, feito a partir dos registos documentais dos processos infecciosos com crescimento bacteriano significativo desde o ano 2010 ao ano 2022. Do total de microrganismos isolados, e considerando o espectro de ação dos antibióticos estudados (Infarmed, 2016), cuja ação bactericida atua contra Gram Negativos, foram selecionadas as *Enterobactereaceaes* e excluídos todos os Gram Positivos por não terem o perfil analítico completo. Também foram excluídos Gram Negativos que não fossem *Enterobactereaceaes* devido à utilização de cartas específicas a AST 355. Todos os géneros bacterianos foram considerados, embora se tenha feito uma triagem para o estudo das multirresistências (de acordo com a seriação EUCAST 2017). Foram valorizados os géneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Proteus* pela sua dimensão. Além disso, foram excluídos do estudo utentes estrangeiros pela baixa expressão.

Os antibióticos que fazem parte do estudo são a Gentamicina e a Amicacina, ambos aminoglicosídeos com o mesmo mecanismo de ação e mesma forma de excreção. Por vezes no trabalho é referido um terceiro antibiótico, que não é mais que o grupo dos Carbapenem, o Imipenem, o Ertapenem e o Meropenem - estes são identificados pela (EUCAST, 2017) como marcadores de multirresistência para as *Enterobactereaceaes*. A EUCAST considera que se um é resistente, estamos na presença de produção de carbapenemases, um fator de multirresistência.

O presente trabalho avalia os processos infecciosos de Gram Negativos, estudados nos setores de microbiologia das três unidades da ULSNE (isto é Bragança, Macedo de Cavaleiros e Mirandela), num total de 10 242 culturas. Os isolados foram obtidos de 7 935 utentes (69,7% do sexo feminino e 30,3% do sexo masculino, dos quais 61,3% dos utentes têm mais de 65 anos de idade). Desta forma, considera-se que se trate de um estudo retrospectivo, descritivo e correlacional.

De todo o universo de Gram Negativos, foram selecionadas, especificamente, as *Enterobacteriaceae*. A amostra é significativa considerando o espaço de tempo abrangido; pode, porém, não ser representativa da população infetada com as bactérias estudadas uma vez que há ainda a considerar o facto de haver muitos utentes que recorrem a tratamentos empíricos sem qualquer estudo cultural.

Dando resposta à atividade da ULSNE e do SPC foram analisados isolados provenientes de infeções urinárias, infeções respiratórias, da corrente sanguínea, de fragmentos cirúrgicos, líquidos orgânicos (ascítico, pleural, sinovial, pericárdico...), zaragatoas de rastreios nasais e fecais, entre outros. Os isolados foram analisadas em contexto clínico de resposta analítica a um processo infeccioso.

Para a presente análise foram solicitados os dados, em ficheiro Excel com resultados dos pacientes em que foram identificadas *Enterobacteriaceae*, com identificação e TSA, para verificar o nível de atividade dos dois aminoglicosídeos propostos. Após a obtenção das autorizações os dados foram fornecidos pela Glintt, empresa detentora da base de dados onde estão armazenados os resultados do SISLAB.

Recuperaram-se todos os dados de resultados com identificação de *Enterobacteriaceae*, em que foi testada a atividade da Gentamicina e da Amicacina. Como marcador de resistência foi considerada a atividade dos carbapenem (Meropenem, Imipenem e Ertapenem).

### **3.1 PROCEDIMENTOS: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS**

Os produtos biológicos usados como objeto de estudo têm etiologia variada, tratando-se maioritariamente de urina, expetoração, sangue, pus, cateter e líquidos biológicos (como líquido ascítico, líquido pleural, líquido Céfalo raquidiano e outros), correspondentes a extrações das várias cavidades do corpo. Os referidos produtos foram tratados de acordo

com a metodologia descrita no manual de procedimentos do setor de microbiologia (Alves, 2019). Os meios de cultura utilizados foram a gelose de MacConkey, Cystine Lactose Eletrolite (CLED), UricultPlus®, CROM ID Carba Smart® e um meio líquido de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI). A descrição química e o objetivo do meio estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Meios utilizados na cultura de isolados bacterianos G-. (Adaptado de Biomerieux, 2023).

<b>Meio</b>	<b>Meio utilizados para o isolamento e diferenciação de <i>Enterobacteriaceae</i> e de outros bacilos Gram-negativos.</b>
<b>MacConkey</b>	<p>Meio diferencial seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de <i>Enterobacteriaceae</i> e uma variedade de outros bacilos Gram-negativos.</p> <p>O meio contém sais biliares (inibidores do crescimento de Gram positivos) e Lactose que permite identificar os fermentadores da lactose. Meio recomendado para amostras com flora microbiana mista.</p>
<b>CLED</b>	<p>O meio de CLED (Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos) serve para cultura, diferenciação e contagem de bactérias provenientes de amostras de urina. Este meio é rico em peptonas, contém lactose como fonte de energia e para verificação do mecanismo de fermentação usa o azul de bromotimol para diferenciar as fermentadoras de lactose.</p>
<b>ChromID Carba smart</b>	<p>É um meio de cultura em biplaca que permite o isolamento e identificação de <i>Enterobacteriaceae</i>s produtoras de carbapenemases. Na placa existe associação de meios que permite detetar OXA-48 num lado e no outro lado outras <i>Enterobacteriaceae</i>s produtoras de Carbapenem, como a KPC e NDM1.</p>
<b>Brain Heart Infusion</b>	<p>É um meio rico em nutrientes, serve de enriquecimento para todo tipo de microrganismos incluindo bactérias de crescimento fastidioso.</p>

Depois de selecionar os meios, há também a ter em consideração a forma de executar a sementeira, a temperatura e o tempo de incubação, assim como a atmosfera de crescimento (Alves, 2019).

**Tabela 2:** Procedimento para obtenção de crescimento microbiológico, (Alves,2019)

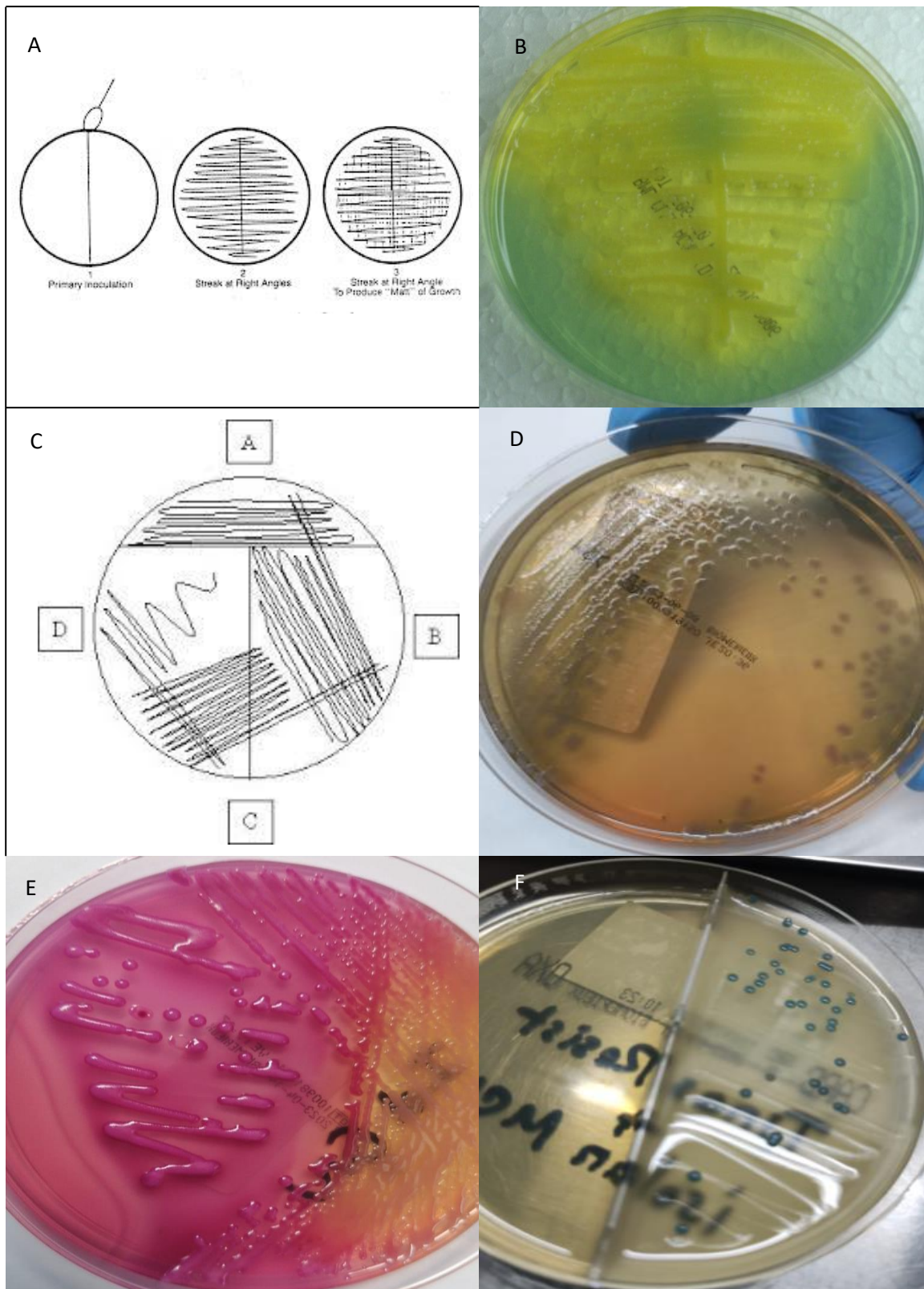
<b>Produto</b>	<b>Meio</b>	<b>Sementeira</b>	<b>Exame direto</b>	<b>Horas incubação/temperatura</b>	<b>Atmosfera</b>
<b>Urina</b>	CLED	Estria central, ansa de 1µL	Gram, exame microscópico do sedimento a fresco	18 – 24 horas/37° C	Normal
<b>Urina</b>	Uricult Plus	Imersão	Gram, exame microscópico do sedimento a fresco	18 – 24 horas/37° C	Normal
<b>Expectoração</b>	MacConkey	Quatro quadrantes (esgotamento)	Gram	18 – 24 horas/37° C	Normal
<b>Líquidos (i.e.: &lt;&lt;líquido pleural, L.C.R., Líquido ascítico, Líquido Biológico)</b>	MacConkey / BHI	Quatro quadrantes (esgotamento)/ 1mL de amostra, será passado para McK no dia seguinte	Gram	18 – 24 horas/37° C	Normal
<b>Cateter</b>	MacConkey	Quatro quadrantes (esgotamento)	Gram	18 – 24 horas/37° C	Normal
<b>Pús</b>	MacConkey	Quatro quadrantes (esgotamento)	Gram	18 – 24 horas/37° C	Normal
<b>Hemocultura</b>	MacConkey	Quatro quadrantes (esgotamento)	Gram	18 – 24 horas/37° C	Normal

Para obtenção de isolados segue-se um padrão de sementeira, como demonstrado na Figura 5. Este procedimento garante a identificação de colónias e o Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA).

A sementeira depende do objetivo e do produto semeado. Para urinas esgota-se 1 µL de amostra sobre a gelose de Cled (imagem A da figura 5), que incubam a 37° C, de 18 a 24h, obtendo-se positivos com crescimento  $\geq 10^5$  de colónias de *E. coli* (imagem B da figura 5). As imagens foram retiradas do Atlas de Microbiologia do SPC-ULSNE.

Para obtenção de *Enterobactereaceae* utiliza-se a sementeira por esgotamento em quatro quadrantes. Dependendo do objetivo da cultura, podem-se semear em Mackonkey (Imagem C e D da figura 5) ou em meio de Chrome para fazer uma identificação direta (imagem F da figura 5).

As *Enterobactereaceae* identificáveis pelo método Vitek Compact 2 na carta GN são: *Budvicia aquática*, *Buttiauxella agrestis*, Género *Cedecea* Género *Citrobacter*, Grupo *Cronobacter*, Género, *Edwardsiella* Género *Enterobacter* Género *Escherichia* Género *Kluyvera* Género *Leclercia*, Género *Moellerella*, Género *Morganella*, Aglomerados de *Pantoea*, Género *Plesiomonas*, Género *Proteus*, Género *Providencia* Género *Rahnella*, Género *Raoultella*, Género *Roseomonas*, Grupo *Salmonella*\*, Génro *Serratia*, Grupo *Shigella*\*, Género *Yersinia*, Género *Yokenella*. (\*OMA Métodos Oficiais de Análise). Adaptado de Biomerieux 2023.



**Figura 5:** Tipos de sementeira de Gram Negativos, métodos usados no SPC-ULSNE. Adaptado de Manual de procedimentos, 2019.

### 3.2 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS (TSA)

Depois de obtidos os isolamentos das *Enterobactereaceae*s, procedeu-se ao TSA. O método usado no SPC é certificado pela Biomerieux ®. O sistema Vitek Compact é um sistema automatizado, com base na técnica relatada por (MacLowry 1968). Consiste num cartão de TSA que é uma micro-versão da técnica de diluição dupla para CMI (Concentração Mínima Inibitória) pelo método de microdiluição. De acordo com a EUCAST (2017), a CMI é a concentração mais baixa de um agente antibacteriano expressa em mg/L ( $\mu\text{g/ml}$ ) que, em condições *in vitro* rigorosamente controladas, impede completamente o crescimento visível da estirpe de ensaio de um organismo.

Os microrganismos a ser testados carecem de uma suspensão numa concentração padronizada em solução salina a 0,45%. Esta suspensão é usada para reidratar o meio antimicrobiano dentro do cartão. O cartão é então preenchido, selado e colocado na incubadora/leitor do equipamento. O instrumento monitoriza o crescimento de cada poço no cartão durante um intervalo de tempo, que pode ir de 6 a 12 horas, definido consoante a bactéria em questão. Ao concluir o ciclo de incubação, os valores de CMI são determinados para cada antimicrobiano contido no cartão.

A CMI assenta na utilização de concentrações de antibióticos derivados de duplas diluições sucessivas (Biomerieux, 2010). É determinada a partir da menor concentração com inibição de crescimento bacteriano, com base no método de diluição em meio líquido (Tabela 3). O cartão utilizado para o nosso estudo foi o AST 355 com um painel de antibióticos para determinar *in vitro* a sensibilidade de *Enterobactereaceae*s, nomeadamente Amicacina e Gentamicina. Cada carta possui 64 micropoços, contendo meios de cultura *Cation-adjusted Muler-hinton broth* (CAMHB). Nesta metodologia usamos Mueller-Hinton Agar (MHA) com concentrações conhecidas dos antibióticos a estudar (Tabela 3); como controlo existe um micropoço que contém meio de cultura (Wikler et al, 2007).

O cartão é preenchido seguindo o protocolo. Após a obtenção de colónias isoladas de *Enterobactereaceae*s, procedeu-se à dissolução das colónias-alvo em 3mL de solução salina entre 0,5 e 0,63 padrão de MacFarland (Wikler et al, 2007). O preparado é a solução para identificação, e desta faz-se uma diluição com 280  $\mu\text{L}$  em 3mL de solução salina a 0,45%. A suspensão obtida é inoculada no cartão de antibiograma AST 355 e colocada a incubar entre 35 a 37° C, em atmosfera de aerobiose, até 24 horas. Um poço, normalmente

o primeiro, contendo caldo de crescimento (desidratado), funciona como controlo positivo de crescimento. Finalizado o tempo de incubação, o sistema automático avalia cada padrão de crescimento das bactérias na presença de antibióticos. Comparando cada poço com o controlo, obtém-se um valor o CMI para os antibióticos testados. Os resultados são traduzidos qualitativamente para sensível ou resistente podendo ser expresso quantitativamente em  $\mu\text{g/ml}$ . As traduções de diluições obtidas para resultados encontram-se descritas na Tabela 3. Especificamente a Gentamicina e a Amicacina são resistentes quando se verifica um crescimento com turbidez traduzida  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$  (Biomerieux, 2023).

**Tabela 3:** Antibióticos e concentrações presentes no AST 355 de Gram Negativos.  
(Adaptado de Bula da carta AST355, Vitek sistem da BIOMERIEUX, 2023)

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentrações</b>	<b>Sensível</b>	<b>Resistente</b>
<b>Amicacina</b>	8,16,64	$\leq 2$	$\geq 64$
<b>Gentamicina</b>	4, 16, 32	$\leq 1$	$\geq 16$
<b>Tobramycina</b>	8,16,32	$\leq 1$	$\geq 16$
<b>Cefepime</b>	2,8,16,32	$\leq 1$	$\geq 64$
<b>Ceftazidime</b>	1,2,8,3	$\leq 1$	$\geq 64$
<b>Ceftriaxone</b>	1,2,8,3	$\leq 1$	$\geq 64$
<b>Ciprofloxacina</b>	0.5,2,4	$\leq 0,25$	$\geq 4$
<b>Levofloxacina</b>	0.25, 0.5,2,8	$\leq 0.12$	$\geq 8$
<b>Meropenem</b>	0.5, 4, 16	$\leq 0.25$	$\geq 16$
<b>Imipenem</b>	2, 4, 16	$\leq 1$	$\geq 16$

### 3.3 DADOS

Os elementos analisados provêm de uma base de dados em Excel solicitada à Glintt®, empresa que gere a produção de resultados, e o Laboratory Informations System (LIS) do SPC, após a obtenção da permissão.

A extração foi feita de acordo com a seguinte requisição: todos os resultados com identificação de Gram Negativos e em que foram testados os antibióticos selecionados (Gentamicina, Amicacina e Carbapenem), com idade, género, proveniência e produto de origem. Os dados extraídos foram analisados. Retiraram-se os erros de transcrição da base de dados, correspondentes a processos de resultados incompletos: isto é, só com um antibiótico. Foram igualmente retiradas bactérias só com um isolamento e sem TSA ou Gram Negativos que não *Enterobactereaceae* e os Gram positivos. Eliminaram-se ainda dados de isolados bacterianos provenientes de utentes com menos de 18 anos.

Esta base continha 53 010 processos de infeção - destes retiraram-se todos os processos descritos no parágrafo anterior, ficando 10 242 processos de identificação em que foi testada a atividade dos 3 antibióticos (Gentamicina, Amicacina e Carbapenem).

Nos últimos anos mudaram as linhas orientadoras das estirpes-alerta e a conceitualização de multirresistente, com o aparecimento de estirpes problema (EUCAST, 2023). Para o presente estudo foram consideradas as linhas orientadoras atuais. Para consideração de multirresistência, foram incluídos os isolados em que foi testada a atividade do Imipenem, Ertapenem e Meropenem.

Feito este trabalho e estabelecidas as variáveis, os dados foram tratados com Excel versão 7.0. Foram feitos teste de probabilidade, de significância e *odds ratio* aos valores possíveis para poder analisar melhor a significância dos valores encontrados e projetar a atividade dos antibióticos.

### 3.4 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O presente estudo, foi autorizado pela Comissão de Ética em 2013 (n.º de processo 0035) e renovada a autorização por parecer do Presidente do Conselho de administração em 2021. No início, este projeto foi desenhado para dois anos; no entanto por questões de

ordem temporal, foi sugerido pela orientadora alargar o espaço temporal do estudo para aumentar a abrangência para conseguir mais confiança dos resultados.

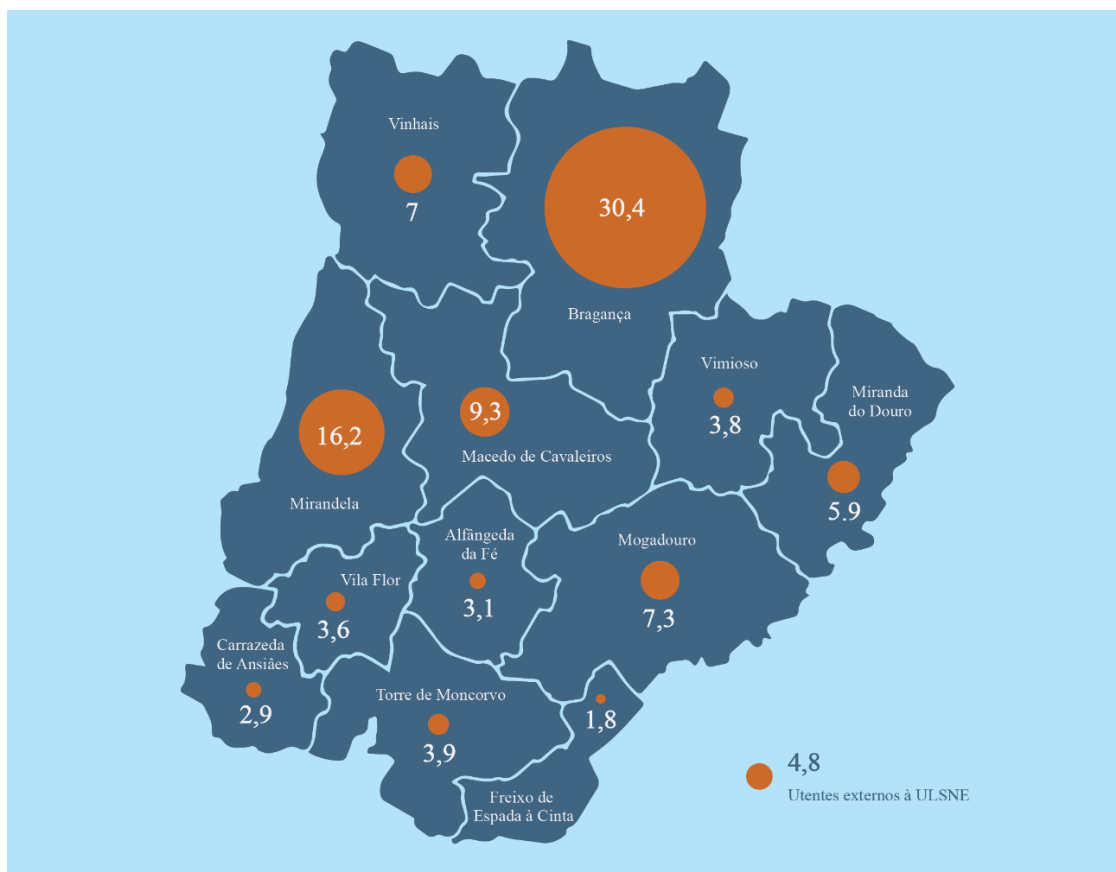
O estudo atendeu aos requisitos legais e éticos pertinentes. A confidencialidade dos dados dos participantes foi assegurada mediante atribuição de um número interno, exclusivo a cada indivíduo, pela Glintt, de forma a garantir o anonimato dos isolados.

#### **4. RESULTADOS**

Os isolados bacterianos pertencem a 10 242 processos infecciosos relativos a 7 935 utentes que provêm geograficamente de todo o país. Os utentes estrangeiros foram retirados. A maior parte dos processos é da área de influência da ULSNE. Observa-se uma maior percentagem de isolados corresponde a Bragança, com 30,4%, seguindo-se por ordem de grandeza de valores Mirandela, com 16,2%, e Macedo de Cavaleiros com 9,3%. Seguem-se, posteriormente, Mogadouro, Vinhais, Miranda do Douro, Torre de Moncorvo, Vimioso, Vila flor, Alfandega da Fé, Carrazeda de Ansiães e Freixo de Espada a Cinta.

A ULSNE representa 95,2% do total de amostras (n = 7 553); os restantes 4,8% representam amostras de utentes de todo o país (n = 382), desde Viana do Castelo a Faro.

As 382 amostras provenientes de utentes de fora da ULSNE deram entrada através dos serviços de atendimento da ULSNE - 41% entraram através da consulta do centro de saúde, 10% através da consulta de especialidade, 0,9% através do Hospital de Dia, 24,2% foram processos de internamento e 20,5% foram processos de urgência.



**Figura 6:** Mapa infográfico dos isolados de *Enterobactereaceas* estudadas.

Dos processos infecciosos considerados, 69,7% (n=5 533) são do sexo feminino e 30,3% (n=2 402) do sexo masculino. Na Tabela 4 encontra-se a distribuição dos utentes por sexo e intervalo de idades: observa-se que predominam as idades entre os 66 a 75 anos, 18,1% (n=1 439); entre os 76 e 85 anos, 28,0% (n=2 218) e entre 86 e 95 anos, 15,2% (n=1 205) em ambos os sexos. Podem-se ver os resultados relativos à atividade dos antibióticos (Amicacina, Gentamicina e como marcador de resistência os Carbapenem) por intervalo de idades. Observa-se que a resistência é mais elevada nos intervalos de idade mais altos, nomeadamente entre os 76 a 95 anos. Pela aplicação do teste do qui-quadrado concluiu-se que a resistência aos antibióticos está significativamente associada ao intervalo de idades, ( $\chi^2=241,543$ ;  $p<0,001$ ), o que levou ao cálculo dos *odds ratio* tendo como referência a faixa etária até 25 anos. Verifica-se, assim, que o grupo etário entre os 66 e 75 anos evidencia um risco de cerca de 1,927 (OD=1,927;  $p<0,01$ ); o grupo etário dos 56 a 65, um risco de cerca de 1,678 (OD=1,678;  $p<0,05$ ); a faixa etária de 46 a 55, apresenta

um risco de 1,558 (OD=1,558;  $p < 0,05$ ) de desenvolver resistência face ao grupo de < de 25 anos.

**Tabela 4** – Caracterização dos utentes por sexo e intervalo de idades

Intervalo de idades (anos)	Sexo		Total	Atividade dos ATB*		Odds ratio (p)	Antibiótico		
	F	M		S	R		Amikacina	Gentamicina	
<b>Até 25</b>	n	274	38	312	1723	26	1†	338	338
	%	5,0	1,6	3,9	3,4	1,5		3,3	3,3
<b>De 26 a 35</b>	N	443	43	486	2761	28	0,672 (0,147)	543	533
	%	8,0	1,8	6,1	5,4	1,6		5,3	5,2
<b>De 36 a 45</b>	N	488	92	580	3531	55	1,032 (0,895)	686	686
	%	8,8	3,8	7,3	6,9	3,2		6,7	6,7
<b>De 46 a 55</b>	N	522	194	716	4593	108	1,558 (0,044)	891	912
	%	9,4	8,1	9,0	9,0	6,3		8,7	8,9
<b>De 56 a 65</b>	N	603	288	891	5925	150	1,678 (0,016)	1168	1188
	%	10,9	12,0	11,2	11,5	8,8		11,4	11,6
<b>De 66 a 75</b>	N	945	494	1439	9666	281	1,927 (0,002)	1946	1188
	%	17,1	20,6	18,1	18,8	16,5		19,0	18,6
<b>De 76 a 85</b>	N	1432	786	2218	15097	635	2,787 (0,000)	3032	3042
	%	25,9	32,7	28,0	29,4	37,3		29,6	29,7
<b>De 86 a 95</b>	N	764	441	1205	7531	399	3,511 (0,000)	1526	1547
	%	13,8	18,4	15,2	14,7	23,4		14,9	15,1
<b>Mais de 95 anos</b>	N	62	26	88	480	21	2,899 (0,000)	103	93
	%	1,1	1,1	1,1	0,9	1,2		1,0	0,9
<b>Total</b>	N	5533	2402	7935	51307	1703		10242	10242
	%	100,0	100,0	100,0	100	100		100	100
<b>Teste do Qui-quadrado <math>\chi</math> (p)</b>				$\chi = 241,543$ (0,000)			$\chi = 2,298$ (0,971)		

$\chi$  (p) – Estatística de teste do qui-quadrado (valor de prova); 1† - Classe de referência para comparação;

\*Atividade dos ATB estudados

Na tabela 5 encontra-se a descrição da proveniência dos utentes que deram origem 10 242 isolados bacterianos, observa-se que 37,09% (n=3 799) são provenientes da Consulta de cuidados primários; 12,90% (n=1 321) provêm da consulta hospitalar; 0,77% (n=79) da HDI; 26,17% (n=2 680) são provenientes do internamento e 23,06% (n=2 361) da urgência.

Nos resultados relativos à resistência aos antibióticos por proveniência do utente, observa-se que a resistência é mais elevada nos isolados bacterianos provenientes do internamento e da urgência.

**Tabela 5** – Caracterização da proveniência dos utentes

Proveniência	n	%	Atividade*		Odds ratio (p)	Antibiótico	
			S n (%)	R n (%)		Amikacina n (%)	Gentamicina n (%)
Consulta comunidade	1266	37,09	3747 (37,8)	49 (14,9)	1†	3871 (37,1)	3789 (37,0)
Consulta hospitalar	1321	12,90	1342 (13,1)	26 (8,0)	1,550 (0,000)	1321 (12,9)	1321 (12,9)
HDI	79	0,77	82 (0,8)	4 (1,3)	4,344 (0,000)	82 (0,8)	72 (0,7)
Internamento	2680	26,17	2591 (25,3)	174 (52,8)	5,301 (0,000)	2683 (26,2)	2663 (26,0)
Urgência	2361	23,06	2366 (23,1)	76 (23,0)	2,525 (0,000)	2357 (23,0)	2397 (23,4)
<b>Total</b>	10242	100	9913 (100)	329 (100)		10242 (100)	10242 (100)
<b>Teste do Qui-quadrado <math>\chi</math> (p)</b>			$\chi = 750,764$ (0,000)			$\chi = 1,272$ (0,866)	

$\chi$  (p) – Estatística de teste do qui-quadrado (valor de prova); 1† - Classe de referência para comparação;

Atividade dos antibióticos estudados (Amikacina, Gentamicina e Carbapenem)

Na tabela 6 encontra-se a descrição das características dos processos infecciosos dos utentes, através do produto destinado a sementeira, dos 10 242 isolados bacterianos. Observa-se que 76,91% (n=7 877) são amostras de urina; 8,63% (n=881) amostras de pus, 6,22% (n=645) amostra de sangue e 4,49% (n=451) correspondem a amostras de expetoração.

Apresenta-se ainda na tabela 6 os resultados relativos à resistência aos antibióticos por produto semeado. No seguimento da aplicação do *odds ratio* em função das urinas, observou-se que os utentes com maior risco de desenvolver resistências são os que têm cateter como fonte de infeção, com 4,939 (OD=4,393; p<0,001), a expetoração com 3,24% (p<0,001) e as outras amostras respiratórias (lavado brônquicos, aspirados/escovados) com 3,24 (OD=3,244; p<0,001), 3,449 (OD=3,449; p<0,001) respetivamente.

**Tabela 6 – Perfil das infeções dos utentes**

Perfis	n	%	Resistência		Odds ratio (p)	Antibiótico	
			S n (%)	R n (%)		Amicacina n (%)	Gentamicina n (%)
Cateter	74	0,72%	208 (0,7)	26 (2,6)	4,939 (0,000)	72 (0,7)	72 (0,7)
Expetoração	471	4,49%	1279 (4,3)	111 (11,2)	3,244 (0,000)	471 (4,6)	451 (4,4)
Fragmento cirúrgico	77	0,75%	208 (0,7)	8 (0,8)	1,360 (0,261)	72 (0,7)	72 (0,7)
Líquido biológico	188	1,84%	565 (1,9)	15 (1,5)	1,016 (0,936)	195 (1,9)	195 (1,9)
Pus	884	8,63%	2528 (8,5)	127 (12,9)	1,879 (0,000)	881 (8,6)	881 (8,6)
Respiratória-outra	43	0,42%	119 (0,4)	71 (7,2)	3,449 (0,000)	41 (0,4)	41 (0,4)
Sangue	637	6,22%	1844 (6,2)	70 (7,1)	1,417 (0,000)	625 (6,1)	645 (6,3)
Urina	7877	76,91%	23017 (77,4)	619 (62,7)	1†	7886 (77,0)	7876 (76,9)

Na tabela 7 encontra-se a repetição de registos que contabilizam a quantidade de reinfeções dos 7 935 utentes, causadas por *Enterobactereaceas*. Em média 88,88% dos utentes tiveram um único registo da infeção por esta família de microrganismos. Observa-se uma percentagem de 2,9% com quatro registos de infeção respiratória (expetoração). Também com quatro registos de infeção pode observar-se infeção na corrente sanguínea com 4,12% e 7,41% com infeção nos tecidos (pus). Este último também aparece em 2,23% com mais de cinco registos. No caso das infeções urinárias observam-se casos de 46,6% de utentes com quatro processos de infeção, 9,35% de utentes com cinco registos e 22,92% de utentes com mais de cinco registos.

**Tabela 7 – Caracterização por tipo de perfil de repetição de infeções**

N.º registos	Proveniência							
	Cateter n (%)	Expetoração n (%)	Fragmento cirúrgico n (%)	Líquido biológico n (%)	Pus n (%)	Respiratória -outra n (%)	Sangue n (%)	Urina n (%)
0	7849 (98,92%)	7464 (94,06%)	7850 (98,93%)	7726 (97,37%)	7055 (88,91%)	7886 (99,38%)	7341 (92,51%)	1561 (19,67%)
1	0 (0,00%)	5 (0,06%)	4 (0,05%)	0 (0,00%)	10 (0,13%)	0 (0,00%)	8 (0,10%)	10 (0,13%)

2	1 (0,01%)	2 (0,02%)	1 (0,01%)	3 (0,04%)	2 (0,03%)	0 (0,00%)	2 (0,03%)	4 (0,05%)
3	15 (0,19%)	56 (0,71%)	8 (0,10%)	6 (0,08%)	33 (0,42%)	7 (0,09%)	26 (0,33%)	111 (1,40%)
4	51 (0,64%)	230 (2,90%)	46 (0,58%)	139 (1,75%)	588 (7,41%)	26 (0,33%)	327 (4,12%)	3688 (46,48%)
5	8 (0,10%)	103 (1,30%)	17 (0,21%)	40 (0,50%)	70 (0,88%)	10 (0,13%)	69 (0,87%)	742 (9,35%)
>5	11 (0,14%)	75 (0,95%)	9 (0,11%)	21 (0,26%)	177 (2,23%)	6 (0,08%)	162 (0,11%)	1819 (22,92%)
<b>Total</b>	7935 (100%)	7935 (100%)	7935 (100%)	7935 (100%)	7935 (100%)	7935 (100%)	7935 (100%)	7935 (100%)

No seguimento da tabela anterior, a tabela 8 evidência a atividade dos antibióticos quando ocorrem reinfeções pelos microrganismos estudados. Observa-se que utentes com repetição de um processo infeccioso têm uma sensibilidade de 36,5% para a Amicacina e 39,3% para a Gentamicina, similar à evidenciada para os carbapenem, 39,92%. Observa-se uma situação similar para quadros infecciosos que se repetem duas vezes (Amicacina com 31,58%; Gentamicina, 31,29% e Carbapenem com 33,18%).

**Tabela 8** – Análise da atividade dos antibióticos face aos processos de repetição de infeções.

Nº registos	Antibiótico		
	Amicacina n (%)	Gentamicina n (%)	Carbapenem n (%)
0	221 (2,79%)	141 (1,78%)	159 (2,00%)
1	2898 (36,52%)	2978 (39,32%)	3168 (39,92%)
2	2506 (31,58%)	2483 (31,29%)	2633 (33,18%)
3	762 (9,60%)	790 (9,96%)	818 (10,31%)
4	476 (6,00%)	469 (5,92%)	461 (5,81%)
5	235 (2,97%)	252 (3,18%)	266 (3,35%)
>5	1150 (14,49%)	403 (5,08%)	430 (5,42%)
<b>Total</b>	7935 (100%)	7935 (100%)	7935 (100%)

A tabela 9 resume a atividade global dos antibióticos estudados, considerando todas as variáveis. Observa-se uma sensibilidade de 94,4% na Amicacina e resistência em 5,6% dos isolados; a Gentamicina apresenta uma sensibilidade de 98,3% e resistência em 1,7%

dos casos; para os Carbapenem os isolados apresentam uma sensibilidade de 87,57% e uma resistência de 12,3%.

**Tabela 9:** Resumo da atividade dos antibióticos enquadrados em todas as variáveis

Antibiótico	Resultado		Total n (%)
	R	S	
	n (%)	n (%)	
<b>Amicacina</b>	574 (5,6)	9668 (94,4)	10242 (100)
<b>Carbapenem</b>	1260 (12,3)	8982 (87,57)	10242 (100)
<b>Gentamicina</b>	174 (1,7)	10146 (98,3)	10242 (100)

$X^2=0,481$ ;  $p=0,786$ .

A prevalência de microrganismos e a sua relação com os antibióticos está expressa na tabela 10. Num total de 10 242 isolados bacterianos, pela ordem de valor de prevalência, observa-se um predomínio do Género *Escherchia* (64,3%), *Klebsiella* (20,1%), *Enterobacter* (5,9%) e *Proteus* (5,6%)<sup>9</sup>. Depois, com valores menos significativos entre 1,37% e 0,03%, observa-se a identificação dos géneros *Morganella*, *Serratia*, *Providencia*, *Raoultella*, *Sphingomonas*, *Yersinia* e *Shigella*.

Nos antibióticos estudados observa-se uma atividade sobre os isolados que ronda, em média, 93,1% para Amicacina, 97,16% para a Gentamicina, 78,18% para os Carbapenem uma média de atividade de 96,47%.

Individualizando a atividade dos ATB, a Amicacina apresenta uma atividade sobre o género *Serratia* (94,34% de sensibilidade), o género *Enterobacter* (92,89% de sensibilidade) e apresenta menor efeito sobre o género *Klesiella* (90,87% de sensibilidade). No caso de Gentamicina o cenário é diferente - verifica-se menor atividade sobre os isolados de *Kelbsiella* (71,6% sensibilidade) e *Proteus* com 80,7% (sensibilidade). Analisando os dados obtidos sobre a atividade dos Carbapenem observa-se uma resistência de 10,40% para o género *Serratia*; 7,40% para o género *Providencia*; o género *Enterobacter* regista 7,60% de resistência e o género *Klebsiella* apresenta 4,70% de resistências.

Com menor expressão, inferior a 1 % de identificações, observa-se uma atividade elevada da Amicacina. No entanto, a Gentamicina já apresenta uma atividade de 18,90% para o

gênero *Providencia*; a *Raoultella*, *Sphingomonas*, *Yersinia* e *Shigella* apresentam um padrão de atividade médio superior a 80% para todos os antibióticos.

**Tabela 10:** Prevalência das *Enterobacteriaceae* isoladas. Relação da atividade dos antibióticos da atividade dos isolados com antibióticos

	Isolados	Amicacina		Gentamicina		Carbapenem	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)
Gênero bacteriano		sensíveis	resistentes	sensíveis	resistentes	sensíveis	Resistentes
<i>Escherchia</i>	6580 (64,3)	6257 (95,09)	323 (4,90)	6088 (92,50)	492 (7,50)	6537 (99,30)	43 (0,70)
<i>Klebsiella</i>	2054 (20,1)	1864 (90,87)	190 (9,30)	1471 (71,60)	583 (28,40)	1957 (95,30)	97 (4,70)
<i>Enterobacter</i>	605 (5,99)	562 (92,89)	43 (7,1)	549 (90,7)	56 (9,30)	559 (92,40)	46 (7,60)
<i>Proteus</i>	575 (5,6)	562 (97,74)	13 (2,30)	464 (80,70)	111 (19,30)	554 (96,30)	21 (3,70)
<i>Morganella</i>	141 (1,37)	138 (97,87)	3 (2,10)	118 (83,70)	23 (16,30)	135 (95,70)	6 (4,30)
<i>Serratia</i>	106 (1,04)	100 (94,34)	6 (5,70)	103 (97,20)	3 (2,80)	95 (89,60)	11 (10,40)
<i>Providencia</i>	95 (0,93)	95 (100)	0 (0)	18 (18,90)	77 (81,10)	88 (92,60)	7 (7,40)
<i>Raoultella</i>	65 (0,63)	65 (100)	0 (0)	63 (96,90)	2 (3,10)	65 (100)	0 (0)
<i>Sphingomonas</i>	11 (0,11)	11 (100)	0 (0)	11 (100)	0 (0)	11 (100)	0 (0)
<i>Yersinia</i>	5 (0,05)	5 (100)	0 (0)	4 (80)	1 (20)	5 (100)	0 (0)
<i>Shigella</i>	3 (0,03)	3 (100)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	3 (100)	0 (0)
Total	10242						

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A ULSNE EPE serve uma população de 122 833 habitantes (INE-PORDATA, 2021). Foram obtidos 10 242 processos relativos a 7 935 utentes (tabela 5). Verifica-se que a maior incidência geográfica (Figura 7), é nas áreas de maior densidade populacional - Bragança (30%), Mirandela (16,2%) e Macedo de Cavaleiros (9,3%), seguidas por Mogadouro e Vinhais. O município com menor número de processos infecciosos é Freixo de Espada a Cinta (município com menor densidade populacional). Trata-se de uma população muito envelhecida - um fator que não se cinge à região, uma vez que Portugal tem um índice de envelhecimento de 172,2% (INE-PORDATA,2021).

Como fonte dos isolados, observa-se que predominam utentes com idades entre os 66 a 75 anos, 18,1% (n=1 439); entre os 76 e 85 anos, 28,0% (n=2 218) e entre 86 e 95 anos, 15,2% (n=1 205). Seguindo o padrão nacional, estes números refletem, portanto, a realidade da população do distrito, que tem um índice de envelhecimento que vai de 261,1% em Bragança a 678,1% em Vinhais (INE-PORDATA,2021). Em relação de género, verifica-se 69,7% (n=5 533) para o sexo feminino e 30,3% (n=2 402) para sexo masculino, o que também é justificável com a realidade nacional em Portugal as mulheres representam 52,43% da população (INE-PORDATA, Censos 2021).

Os utentes com maior risco de desenvolver resistência encontram-se nas faixas etárias compreendidas entre 76 - 85 anos, 86 e 95 anos e com mais de 95 anos, cerca de 2,787 (OD=2,787;  $p < 0,001$ ); 3,511 (OD=3,511;  $p < 0,001$ ) e 2,899 (OD=2,899;  $p < 0,001$ ), de adquirir resistência aos antibióticos estudados face aos utentes com idade até 25 anos, como foi possível apurar na Tabela 4. Considerando, no entanto, a atividade da Amicacina e da Gentamicina, observa-se que está variável não está significativamente associada ao intervalo de faixa de idades dos utentes, ( $\chi = 2,298$ ;  $p = 0,971$ ), sendo equilibrada a distribuição por cada intervalo de idades.

Observa-se que a resistência é mais elevada nas faixas mais altas, nomeadamente entre os 76 a 95 anos. Pela aplicação do teste do qui-quadrado concluiu-se que a resistência aos antibióticos está significativamente associada isolados desta faixa etária, ( $\chi = 241,543$ ;  $p < 0,001$ ). Estes dados são justificáveis na medida que é a partir dos 65 anos que se verifica uma perda da imunidade adaptativa, esta compromete a resposta natural às infeções bacterianas (Jones, 2012).

Em relação à origem da prescrição, na análise da atividade da Amicacina e da Gentamicina observou-se que não estava estatisticamente associada à proveniência do utente, ( $\chi=1,272$ ;  $p=0,866$ ), sendo equilibrada a distribuição pelos tipos de proveniência.

Pela aplicação do teste do qui-quadrado concluiu-se que a resistência ao antibiótico estava significativamente associada à proveniência do utente ( $\chi=750,764$ ;  $p<0,001$ ), o cálculo dos *odds ratio* demonstra como referência a consulta de cuidados primários. Observou-se que os utentes da consulta hospitalar apresentaram risco superior em cerca de 1,550 (OD=1,550;  $p<0,001$ ); os utentes do HDI apresentaram risco de cerca de 4,334 (OD=4,334;  $p<0,001$ ); os utentes de internamento ou em urgência apresentaram risco de 5,301 (OD=5,301;  $p<0,001$ ) e 2,525 (OD=2,525;  $p<0,001$ ), respetivamente, de vir a apresentar resistência ao antibiótico quando comparados com utentes da consulta de cuidados primários (Tabela 5).

Como anteriormente referido, os isolados obtidos provêm de infeções diversas. Na tabela 6 estão representadas as origens da infeção: cateter, fragmento cirúrgico, líquido biológico e respiratória-outra com baixas percentagens; no entanto, surgem infeções do trato urinário com elevada percentagem, 76,91% ( $n=7\ 876$ ). Em Portugal são reportadas 24 000 infeções urinárias por ano de acordo com a plataforma do sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE,2023). Pela ordem de importância numérica podemos observar exsudados de feridas (pus) com 8,63%, sangue com 6,22%, estas últimas estão associadas a processos de septicemia, de acordo com a SINAVE. Em 2017 foram notificados em Portugal 214 casos de sépsis por dia. Por último, aparecem dentro do grupo significativo as expetorações com 4,49% de infeções. Todos estes registos traduzem diversidade de infeções que permitem uma maior variedade na etiologia das bactérias isoladas e na atividade dos antibióticos estudados.

As *Enterobactereaceae* constituem a flora infecciosa mais predominante no meio hospitalar e extra-hospitalar. Na tabela 10, observa-se uma ecologia diversificada que segue os padrões de outros trabalhos feitos na ULSNE (Correia, 2007), *E. coli* 51,3%, *K. pneumoniae* 16,6% e *P. mirabilis* 7,8%. A diversidade de flora com menos significado numérico vai desde o género *Enterobacter* até ao género *Shigella*.

Outro dos pontos em análise neste trabalho é o aspeto representado na tabela 8, alusivo a casos de reinfeção. Tendo em conta uma população de 7 935 utentes que apresentam 10

242 isolados bacterianos com identificação de *Enterobactereaceaes*, isto pode representar uma reinfeção ou outros processos infecciosos com este tipo de baterias comum em utentes com mais de 65 anos, correspondentes a 56,9% (tabela 1). No que diz respeito à infeção, verificou-se a prevalência de infeções urinárias 76,91% (tabela 6) por *E. coli* (tabela 7). 81,3% das infeções urinárias pertencem a utentes do género feminino, justificável pela anatomia do trato urinário e proximidade do ponto de origem (Grabe 2011). Observa-se que 39,3 % dos utentes apresenta uma infeção, 33,23% com 2 infeções, 10,33% apresenta 3 infeções e depois há uma variação a 6,14% com quatro infeções, apresentando um perfil de atividade antibioterapia similar ao observado no quadro geral.

Observam-se sensibilidades na ordem dos 66,4 % para a Amicacina e 67,6% a Gentamicina. Segundo Léger, (2017) a maioria dos bacilos de Gram Negativo são suscetíveis aos aminoglicosídeos desde que não apresentem multirresistência.

No traçado final observam-se as resistências e multirresistências (representadas pelas resistências aos Carbapenem: Imipenem, Ertapenem e ou Meropenem). Neste campo, nas tabelas 9 e 10, vemos como há uma taxa de resistência baixa e que está intimamente ligada ao circuito de resistência dos Carbapenem que, desde 2007, aumentou ligeiramente (Carlos, 2007). Para as bactérias multirresistentes existem protocolos que permitem ultrapassar o problema, promovendo a utilização em associação com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ou com vancomicina e assim aumentar significativamente a atividade antibacteriana (Xu et al., 2017).

## CONCLUSÕES

A atividade dos aminoglicosídeos face aos produtos isolados, sem ter em atenção variáveis específicas continuam a exercer um efeito bactericida significativo contra as *Enterobactereaceaes*. Salienta-se que o antibiótico natural tem maior efetividade que o semissintético.

Não há evidencia de associação da diminuição da atividade da Amicacina e da Gentamicina por faixa etária do utente, ( $\chi^2=2,298$ ;  $p=0,971$ ). Também não ficou provado que haja uma maior ou menor atividade tanto da Gentamicina como da Amicacina na variável, género. Concluiu-se também que a atividade dos antibióticos não está

significativamente associada à proveniência produto, ou seja, origem da infecção, ( $\chi^2=1,272$ ;  $p=0,866$ ).

Quando se avalia a atividade dos antibióticos face aos géneros bacterianos vê-se uma diminuição da atividade e um aumento das resistências, quando se trata de Géneros como *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* e não menos preocupante o Género *Klebsiella* face à Gentamicina.

Os antibióticos estudados apresentam uma taxa de atividade (sensibilidade face aos isolados estudados) entre os 60 e 70% - dado o universo de antibioterapia atual, é uma capacidade de resposta adequada e confiável.

Na análise das reinfeções, ou repetições de processos infecciosos provocadas pela Família Enterobacteriaceae, verifica-se que o aumento de infeções diminui a atividade tanto da Amicacina como da Gentamicina. Pela distribuição das sensibilidades nas reinfeções/novos processos infecciosos pode-se verificar o papel importante destes antibióticos, uma vez não há evidência estatística de haver uma correlação direta entre a resistência e o maior número de infeções por *Enterobacteriaceae*.

Também era de interesse avaliar as multirresistências e o seu papel na atividade dos aminoglicosídeos – nesse sentido, verificou-se um aumento das resistências, especialmente para os Géneros já marcados, *Klebsiella*, *Providencia*, *Proteus* e *Serratia*.

Em suma, os aminoglicosídeos ainda apresentam atividade sobre a maioria das *Enterobacteriaceae*, no entanto o cenário não é promissor, já se desenha um quadro de resistências que poderá comprometer o futuro do tratamento das *Enterobacteriaceae* em monoterapia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, M.M.; Nobre, E.; Ervedosa, S; e Silva, A. (2019) *Manual de procedimentos do setor de microbiologia*. Serviço de Patologia Clínica da ULSNE. Documento não editado.

Baptista M.G.F.M. (2013) *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos*, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Saúde. Lisboa, p. 01-28.

Baylis, C. L., Penn, C. W., Thielman, N. M., Guerrant, R. L., Jenkins, C., & Gillespie, S. H. (2006). *Escherichia coli and Shigella spp. Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), (2nd ed., pp. 347-365). England, UK.

Biomerieux Portugal. (2023) (s.d.) *VITEK® 2 AST Cards*. Disponível em VITEK 2 AST Cards | bioMérieux Portugal. <https://biomerieux.pt>. (consultado em julho de 2023). (necessária Chave de cliente).

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2014). *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg* - 26. ed. AMGH Editora 110, 253,255. ISBN 0071510540.

Brunton L., Lazo J. S., Parker K. L., (2006) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman & Gilman's 11th ed. New York: McGraw-Hill. .

Chambers, H. F. (2010). *Aminoglicosídeos e espectinomina*. In: Farmacologia básica e clínica. 10 ed. São Paulo: McGraw Hill, p.681-687.

Correia, C. (2007) *Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos*. Em *Acta Medica Portuguesa* 2007; 20: 543-549.

Cohen, M. B., Nataro, J. P., Bernstein, D. I., Hawkins, J., Roberts, N., & Staat, M. A. (2005). *Prevalência de Escherichia coli diarreio gênica na enterite aguda da infância: estudo prospectivo controlado*. *Jornal de Pediatria*, 146(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.08.059>.

Control Disease Center Europe. (2008) *This factsheet for experts defines antibiotic resistance and its causes.* (<http://ecdc.europa.eu/pt/eaad/antibiotics-get-informed/factsheets/Pages/general-public.aspx>). Consultado em outubro de 2022.

Direção Geral de Saúde. (2017) *Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos.* SNS\_DGS\_PCIRA\_V8.pdf (sns.gov.pt).

Direção Geral de saúde. (2015) *Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos* - Portal das Normas Clínicas. (s.d.). Normas.dgs.min-Saude.pt. Consultado em 22 de outubro de 2023.

EUCAST (2017), *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.* Disponível em [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf) (Consultado em 15 de setembro 2023).

Grabe M, Tenke P, Wagenlehner FM, Naber KG. (2011). *Revisão crítica das definições atuais de infecções do trato urinário e proposta de um sistema de classificação EAU/ESIU.* International Journal of Antimicrobial Agents.38 Supl:64-70. DOI: 10.1016

Instituto Nacional de estatística (2021) *Índice de Envelhecimento e outros indicadores de envelhecimento.*

<https://www.pordata.pt/portugal/indice+de+envelhecimento+e+outros+indicadores+de+envelhecimento-526> (Consultado a 15 de setembro de 2022).

Infomed – *Base de dados de medicamentos do Infarmed.* Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/> (Consultado a 15 de setembro).

Jones, M. B.; Nierman, W. C.; Shan, Y.; Frank, B. C.; Spoering, A.; Ling, L.; Povos, A.; Zullo, A.; Lewis, K.; Nelson, K. E. (2017); *Reducing the bottleneck in discovery of novel antibiotics.* Microbial Ecology. v. 73, n. 3, p. 658-667.

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians.* Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology, 33(3), p.300–305.

Khan, H.A.; Baig, F, K; Mehboob, (2017). *Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance*. Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine, p. 478-482.

Leggett, J. E. (2017) *Aminoglycosides. Infectious Diseases* (Fourth Edition). em 1233–1238.

Louis Sanford Goodman, Gilman, A., Brunton, L. L., Chabner, B. A., & Knollmann, B. C. (2012). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Mcgraw-Hill Medical.

MacLowry, J. D., & Marsh, H. H. (1968). *Semiautomatic microtechnique for serial dilution-antibiotic sensitivity testing in the clinical laboratory*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 72(4), 685–687.

Magiorakos A.P., et al. (2012) *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan-drugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect;18:268- 81.

Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). *Aminoglycosides: activity and resistance*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 43(4), 727–737. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.727>

Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016) *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. Microbiol. Spectr.

Murata, T., Iida, T., et al. (2001). *A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens**. J Infect Dis, 84, 8, 1050–5.

Murray P, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller, (2006). *Microbiologia Médica*, Ed. Elsevier, Espanha.

Murray, C. J. (2019). *Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis*. The Lancet, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

Organização das Nações Unidas. (2023). *OMS destaca prioridades de pesquisa sobre resistência antimicrobiana*. ONU News. <https://news.un.org/pt/story/2023/06/1816537>, (consultado em julho de 2023).

Organização Mundial de Saúde, 2022. *OMS: Relatório alerta para aumento de resistência a antibióticos em infecções bacterianas*. ONU News. <https://news.un.org/pt/story/2022/12/1806582>, (consultado em julho de 2023).

Pombo, G., (2018). *Relatório de Vigilância epidemiológica da CHNE*. Direção Geral da Saúde: Relatório anual de multirresistências da Comissão de Controlo de Infecção. Não disponível para consulta.

Ribeiro, A. (2017). *Farmacologia dos antibióticos aminoglicosídeos*. Bdigital.ufp.pt. <http://hdl.handle.net/10284/6570>.

Ribeiro, R.; Morosini, M.I. (2011). *Emergência e disseminação da resistência aos antibióticos após exposição a antibióticos*. FEMS Microbiol. Rev., 35, 977–991.

Rice LB. (2008) *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. J Infect Dis. 197:1079–81.

Sousa, J.C. et al; (2016) *Antibióticos*, Volume I; 1ª ed. - Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, - 370.

Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa – um fenómeno de resistência bacteriana*. Jornal de Microbiologia Médica, 58(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>.

Tamma, P. D., Cosgrove, S. E., & Maragakis, L. L. (2012). *Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria*. Clinical microbiology reviews, 25(3), 450–470. <https://doi.org/10.1128/CMR.05041-11>

Tavares, W. (2001). *Aminociclítóis aminoglicosídeos*. em *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. (pp. 573–626). Atheneu.

Biomerieux (2023) *VITEK® 2 GN ID card - produtos de diagnóstico clínico*. *Diagnóstico Clínico* (biomerieux-diagnostics.com). Consultado em 12/11/2023.

Kysakh, A.; Abhilash, S.; Kuriakose, J; midhun, S.J.; Jyothis, M.; Latha, M.S (2018) *Protective Effect of Lour aquatic Labeling against gentamicin induced oxidative stress and nephrotoxicity in Wistar rats*. Biomedicine and Pharmacotherapy. V. 106, p1 188-94.

Wiederhold C. (2020) *Temas de Bacteriologia y Virologia Medica*. Scribd. Consultado em 22 de outubro de 2023 em <https://pt.scribd.com/document/458350204/Temas-de-Bacteriologia-y-Virologia-medica-2006-pdf>.

Wikler, (2019) M100: *Padrões de teste de sensibilidade antimicrobiana*. Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais; CLSI.  
<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100>.

Yao, J. D. C., & Moellering, R. C. (2011). *Agentes Antibacterianos*. *Manual de Microbiologia Clínica*, 1041–1081. <https://doi.org/10.1128/9781555816728.ch65>.

Zimmer C., (2012). *microcosm E. coli and the science of life*, The Journal of Clinical Investigation. 2008 Dec;118(12) 3818-3818. PMID: PMC2586741.