

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Avaliação de dois métodos automáticos (Vitek 2 e dRAST) no estudo da suscetibilidade aos antibióticos**

**Mariana do Carmo Mesquita Marques**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2020**

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



## **Avaliação de dois métodos automáticos (Vitek 2 e dRAST) no estudo da suscetibilidade aos antibióticos**

**Mariana do Carmo Mesquita Marques**

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

**Orientadora:** Pierrette Melin

**Co-Orientadora:** Professora Associada Jubilada, Maria Aida da Costa e Silva da Conceição Duarte

**2020**

**Liège Université**  
**Centre Hospitalier Universitaire de Liège**



**Avaliação de dois métodos automáticos (Vitek 2 e dRAST) no estudo da suscetibilidade aos antibióticos**

**Mariana do Carmo Mesquita Marques**

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

**Orientadora:** Pierrette Melin

**Co-Orientadora:** Professora Associada Jubilada, Maria Aida da Costa e Silva da Conceição Duarte

**2020**

## Resumo

Infeções graves presentes no sangue, por exemplo septicémias, são relevantes a nível clínico e económico. (1) Na sua gestão é importante obter resultados identificativos precisos, bem como saber a espécie e suscetibilidade aos antibióticos. (2)

Tendo em conta que existem métodos morosos no que respeita o tempo de processamento, a ciência encontra-se em constante evolução, com a invenção de novos métodos, capazes de originar resultados cada vez mais rapidamente. Um deles é o dRAST, Direct Rapid Antibiotic Susceptibility Test. (3) O dRAST tem a vantagem de utilizar alíquotas sanguíneas retiradas diretamente das hemoculturas positivas, permitindo reduzir o tempo necessário até à obtenção dos resultados. (4)

Neste projeto, com o objetivo de avaliar a performance do dRAST, efetuou-se o estudo de 150 isolados bacterianos de 11 espécies Gram negativo para 13 antibióticos, e 100 isolados bacterianos de 8 espécies Gram positivo, para 13 antibióticos também. Realizou-se a comparação com o método de referência Vitek 2, no sentido de estimar a precisão do método dRAST.

Relativamente aos resultados, no total das 1563 análises, 88,74% dos isolados bacterianos Gram negativo apresentaram resultados congruentes entre os dois métodos, com 39,67% de Essential Agreements, 20,73% de Categorical Agreements e 28,34% de Different Agreements. Sendo assim, o médico iria prescrever o mesmo antibiótico se baseasse a sua decisão no dRAST ou no Vitek 2, em 88,74% dos casos. A nível de erros, os Major e os Minor Errors encontram-se dentro do intervalo aceitável. Apenas os Very Major Errors excederam o intervalo limite para validar o método.

Para o total de 814 análises a isolados bacterianos Gram positivo, 92,51% dos resultados levam à mesma decisão clínica entre o dRAST e o Vitek 2, com 42,75% de Essential Agreements, 34,28% de Categorical Agreements e 15,48% de Different Agreements. Relativamente aos erros obtidos, mais uma vez, apenas os Very Major Errors se encontram acima do limite permitido para a validação deste método.

Como conclusão, os resultados obtidos no dRAST são, na maioria, equivalentes aos obtidos no Vitek 2. Na prática, o dRAST poderia ser utilizado na determinação de suscetibilidades a antibióticos em laboratórios clínicos, tornando-se um método validado.

**Palavras-Chave:** septicémia, antibióticos, suscetibilidade, dRAST, bactérias

## Abstract

Serious blood infections, like septicemia, are relevant clinically and economically. (1) To manage it, it's important to obtain precise identifying results, as well to know the specie and antibiotic susceptibility. (2)

Considering that exist time consuming methods, science is in constant evolution, with the invention of new methods capable of give results faster and faster. One of this methods is dRAST, Direct Rapid Antibiotic Susceptibility Test. (3) dRAST has the advantage of using blood aliquots directly taken from positive blood cultures, allowing to reduce the time until we have the results. (4)

In this project, with the goal of the performance evaluation of dRAST, we did the study of 150 bacterial isolates from 11 Gram negative species to 13 antibiotics, and 100 bacterial isolates from 8 Gram positive species, to 13 antibiotics also. We did the comparison with the *standard* method Vitek 2, with the aim of knowing the accuracy of dRAST.

According with the results, for the total of 1563 analysis done from bacterial isolates Gram negative, 88,74% of the results were consistent between the two methods, with 39,67% of Essential Agreements, 20,73% of Categorical Agreements and 28,34% of Different Agreements. This way, the doctor will prescribe the same antibiotic if he based his decision in dRAST or in Vitek 2, for 88,74% of the cases. Relatively to the errors, the Major and Minor Errors are between the acceptable threshold range. Only the Very Major Errors exceed the limit to consider the method validation.

For the total of 814 analysis done from bacterial isolates Gram positive, 92,51% of the results origin the same clinical decision between dRAST and Vitek 2, with 42,75% of Essential Agreements, 34,28% of Categorical Agreements and 15,48% of Different Agreements. According with the errors, once again, only the Very Major Errors were above the limit to validate the method.

As a conclusion, the results obtain by dRAST are, in its majority, equivalents with the ones obtain by Vitek 2. Practilly speaking, dRAST could be utilized for the determination of antibiotic susceptibilities in clinical laboratories, becoming a validated method.

**Key words:** septicemia, antibiotics, susceptibility, dRAST, bacteria

## Índice Geral

	Página
Introdução	10
1 – Infeções sanguíneas	10
2 - Tratamento empírico de infeções graves	10
3 – Melhoria do uso da antibioterapia com a realização de antibiogramas	11
4 - Bactérias multirresistentes no hospital	12
4.1 - Bactérias Gram negativo	12
4.2 - Bactérias Gram positivo	14
5 - Métodos de identificação bacteriana e de determinação da suscetibilidade aos antibióticos	16
5.1 - Vitek 2	16
5.2 - Direct Rapid Antibiotic Susceptibility Test (dRAST)	18
5.3 - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS)	23
6 – Objetivos	24
Materiais e Métodos	25
7 – Isolados bacterianos estudados	25
8 – Antibióticos utilizados	25
9 - Método de incubação das hemoculturas – BacT/ALERT®	26
10 - Métodos de identificação tradicionais	27
10.1 – Gram	27
10.2 - Meios de cultura específicos para bactérias Gram positivo e Gram negativo	27
11 - Métodos de identificação e TSA automatizados	28
12 - Validação dos resultados e métodos	29
13 - Critérios de interpretação dos resultados segundo EUCAST 2020	29
Resultados, discussão e conclusão	31
14 – Espécies bacterianas permitidas	31
15 – Caracterização dos resultados apresentados nas tabelas	31
16 – Percentagens de erro aceites para os resultados	32

	Página
17 – Tabelas com resultados referentes a bactérias Gram negativo	32
18 – Tabelas com resultados referentes a bactérias Gram positivo	36
19 – Discussão e conclusão	39
Referências Bibliográficas	41
Anexos	44
1 – Tabelas referentes a antibióticos estudados com bactérias Gram negativo	44
2 – Tabelas referentes a antibióticos estudados com bactérias Gram positivo	53

## Índice de figuras

	Página
Fig. 1 – Pirâmide das doenças infecciosas	11
Fig. 2 – Enzimas responsáveis pela resistência aos Carbapenemos na Europa, 2015	13
Fig. 3 – Percentagem de isolados de <i>E. faecium</i> resistentes à vancomicina, por país, em 2014	15
Fig. 4 – Percentagem de isolados da <i>E. faecium</i> resistentes à vancomicina, por país, em 2018	15
Fig. 5 – Carta descartável para TSA	16
Fig. 6 – Curva de crescimento bacteriano	17
Fig. 7 – Atividade de um microrganismo com diferentes concentrações de um mesmo antibiótico	17
Fig. 8 A e 8 B – listas com os antibióticos, e em que concentrações, utilizados no dRAST, para bactérias Gram positivo e Gram negativo	18
Fig. 9 – Imagem exemplificativa dos painéis, gel de agarose e meio de cultura utilizados no dRAST	19
Fig. 10 – Fotografias do crescimento bacteriano em diferentes tempos (horas)	20
Fig. 11 – TSA automáticos com a deteção da formação de microcolónias	21
Fig. 12 – Tempo médio necessário para obter os resultados a partir dos testes de suscetibilidade a hemoculturas positivas – comparação do dRAST aos métodos convencionais	22
Fig. 13 – Tempo médio necessário para obter os resultados a partir dos testes de suscetibilidade a hemoculturas positivas – comparação entre bactérias Gram positivo e Gram negativo, para o dRAST e Vitek 2	22
Fig. 14 – Esquema do MALDI TOF MS	24
Fig. 15 – Lista correspondente aos antibióticos para os quais foram analisadas as bactérias Gram negativo	25
Fig. 16 – Lista correspondente aos antibióticos para os quais foram analisadas as bactérias Gram positivo	26
Fig. 17 – Frascos de hemoculturas utilizados no sistema BacT/ALERT®	26
Fig. 18 – Disk Diffusion Test	28
Fig. 19 A e B – Listas com as espécies bacterianas permitidas no dRAST e quais foram estudadas	31

## Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1 – Estudo efetuado à ciprofloxacina para as espécies <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	33
Tabela 2 – Estudo efetuado à piperacilina + tazobactam para as espécies <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	34
Tabela 3 – Análise efetuada aos 13 antibióticos para as espécies <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	35
Tabela 4 – Estudo efetuado à eritromicina para a família <i>Staphylococcus</i> spp.	36
Tabela 5 – Estudo efetuado à teicoplanina para as espécies <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	37
Tabela 6 – Análise efetuada aos 13 antibióticos para as espécies da família <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.	38

## Introdução

### 1 - Infecções sanguíneas

Infecções sanguíneas, como a septicemia, ameaçam a vida humana. Além de que representam um elevado custo para todas as regiões económicas. (1) Estas infeções são comuns em pacientes internados nas Unidades de Cuidados Intensivos, estando associadas a uma elevada morbidade e mortalidade. Dois dos fatores de virulência que estão na origem destas infeções são a endotoxina ligada ao lipopolissacarídeo (LPS) nas bactérias Gram negativo e o superantigénio nas bactérias de Gram positivo.

Uma toxina é uma substância que altera o metabolismo normal das células do hospedeiro, com efeitos prejudiciais para este. É um fator de virulência, e existem duas categorias: exotoxinas e endotoxinas. A endotoxina, ou lípido A, encontra-se no LPS, localizado na membrana exterior da parede celular das bactérias Gram negativo, sendo libertado aquando da lise do microrganismo. É responsável pela ocorrência de febre, ativação da cascata de coagulação e inflamação no hospedeiro. Esta situação poderá resultar em choque séptico, uma inflamação geral causada por grande concentração de lípido A no sangue, sendo uma situação irreversível.

As exotoxinas são proteínas solúveis, secretadas por bactérias Gram positivo. Normalmente são libertadas enquanto ocorre crescimento bacteriano, podendo chegar a outras células, tecidos e órgãos pela corrente sanguínea. As exotoxinas são capazes de provocar uma resposta imunológica drástica, resultando em toxicidade sistémica e supressão da resposta imunitária específica do hospedeiro. Os superantigénios são fatores de virulência, responsáveis por morte celular. Um exemplo de um superantigénio é a toxina da síndrome do choque tóxico (TSTT), produzida por algumas estirpes de *Staphylococcus aureus*.

### 2 - Tratamento empírico de infeções graves

Para gerir este tipo de infeções mais graves os microbiologistas clínicos precisam de resultados identificativos precisos, no sentido de saberem qual a espécie que está a causar a infeção, qual o perfil de suscetibilidade e identificar a origem da infeção. (2)

Como é necessário algum tempo para obter este tipo de informação, a maioria das infeções são tratadas empiricamente, em particular, com antibioterapia de largo espectro. (5) São administradas doses mais elevadas numa duração mais reduzida, como tentativa para impedir a emergência e seleção de microrganismos resistentes. (6) No entanto, é possível melhorar o uso dos antibióticos, com base em características individuais de cada paciente, como: a apresentação clínica, flora predominante e perfis de suscetibilidade aos antibióticos. De acordo com a representação esquemática apresentada na figura 1 há uma relação estrita entre a terapia, o hospedeiro e a bactéria que causa a infeção. (7)

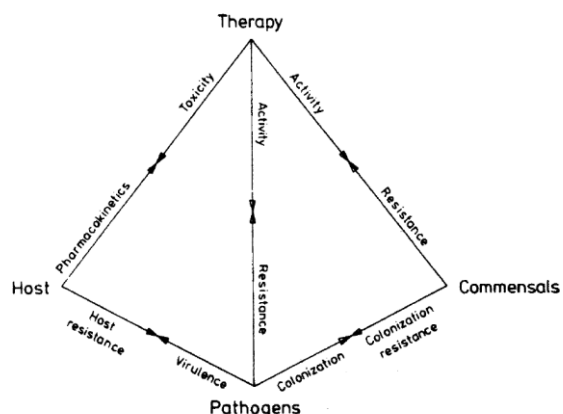


Fig.1 – Pirâmide das doenças infecciosas

Existem, também, fatores contribuintes para esta falha terapêutica, como: a idade e debilidade, exposição prévia ao mesmo antibiótico, uso de antibióticos de espectro alargado, estadias hospitalares prolongadas, presença de dispositivos médicos invasivos e desrespeito pela dose e duração de tratamento. (6) Neste assunto o provérbio “quanto mais cedo, melhor” aplica-se, para ser possível reduzir as taxas de mortalidade, complicações e custos em saúde. (8) Assim que os resultados estão disponíveis, é necessário implementar uma antibioterapia mais direcionada (e de menor espectro) ao microrganismo identificado. Este processo é especialmente necessário para os microrganismos potencialmente resistentes aos antibióticos. (9)

Em contrapartida, existem estratégias para superar as falhas terapêuticas, como: a consulta de infeciologistas, basear as decisões nos microrganismos patogénicos mais comuns em meio hospitalar, métodos de identificação rápidos, diminuição do tempo de utilização dos dispositivos médicos invasivos e de permanência hospitalar, combinações e rotação de antibióticos. (10)

### 3 - Melhoria do uso da antibioterapia com a realização de antibiogramas

A gestão da utilização dos antibióticos é definida pela seleção, posologia e duração terapêutica. Por sua vez, vai ser determinada a melhor resposta clínica no tratamento ou prevenção de uma infeção. Tem como finalidade ser uma escolha ponderada, com o mínimo de toxicidade para o paciente. (11)

Este programa tem três objetivos:

- Selecionar e usar a terapêutica antibiótica da melhor – e mais inteligente - forma possível, respeitando a política dos “4 D’s” – com a escolha do fármaco certo, na dose certa, com a duração do tratamento apropriada e sendo efetuada uma de-escalada terapêutica (com ajuste da dose ou substituição de um fármaco por outro);
- Evitar o uso excessivo ou incorreto dos antibióticos;
- Minimizar o desenvolvimento de resistências.

A gestão da terapêutica antibiótica oferece, ainda, a possibilidade de comparar taxas de suscetibilidade e resistência com outros hospitais, permitindo determinar tendências e

padrões a nível nacional, ou mesmo para um continente inteiro, com cooperação entre vários países. Existe, também, a possibilidade de ocorrerem diferentes padrões dentro de um mesmo hospital. (12) Os níveis de cura e sobrevivência tornam-se superiores com a utilização dos dados obtidos, permitindo uma redução de custos em saúde.

Há que ter em conta que cada programa é específico, não havendo uma guideline que se transponha a todo o mundo. Sendo assim, é necessária flexibilidade nas decisões de cada hospital, mantendo presente a variabilidade do processo. Existem apenas princípios gerais por onde cada responsável regional ou hospitalar se pode guiar, chamados de “Hospital Core Elements”. (37) Este documento refere uma equipa multidisciplinar, com profissionais de diferentes ramos (médicos gerais e infeciologistas, farmacêuticos, enfermeiros) que deve estar presente em cada local. Além disso, menciona o papel relevante do laboratório de Microbiologia, fazendo as análises necessárias para auxiliar na revisão da primeira terapêutica, implementando testes rápidos para o diagnóstico das infeções e servindo como suporte às decisões dos médicos, com relatórios detalhados e concretos. (13)

Com base neste programa, foi feita a seleção dos antibióticos a testar no dRAST. Assim, foram selecionados antibióticos mais comumente utilizados na prática clínica, que constituem as primeiras linhas de tratamento antimicrobiano para certas bactérias.

## **4 - Bactérias multirresistentes no hospital**

### **4.1 - Bactérias Gram negativo**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) referiu-se à resistência aos antibióticos como um assunto que afeta a segurança da saúde mundial, que necessita de ação em todos os setores governamentais e da sociedade como um todo. Foi então publicada uma lista de bactérias resistentes. Nesta lista encontram-se as *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL-E) e as *Enterobacteriaceae* produtoras de Carbapenemases (CPE), possíveis de se encontrar por todo o globo. Estas bactérias estão associadas a um aumento da taxa de mortalidade e custos em cuidados de saúde, mais tempo necessário até a antibioterapia fazer efeito e, portanto, estadias hospitalares prolongadas. (14)

As *Enterobacteriaceae* são uma família de bactérias que incluem: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., e *Enterobacter* spp. São uma causa comum de infeções adquiridas em meio hospitalar, sendo que também foram encontradas infeções adquiridas na comunidade. Estas bactérias apresentam multiresistência aos antibióticos, dada a aptidão em adquirirem genes que expressam proteínas capazes de hidrolisar os antibióticos, um dos principais mecanismos de resistência que as bactérias utilizam para inactivar os antibióticos.

Estas proteínas têm actividade enzimática, vulgarmente denominadas de  $\beta$ -lactamases, estando agrupadas em 4 classes – A, B, C, D - de acordo com “Ambler Classification System”. As classes A, C e D têm como centro ativo uma serina, enquanto a classe B tem um ião zinco no centro ativo, denominado de metaloenzima. As enzimas das CPE pertencem a três classes: A, B e D. (15) Por este motivo, existe uma relevante preocupação por parte da Organização Mundial de Saúde. Como tal, é justificação para a existência de métodos identificativos e testes de suscetibilidade a antibióticos cada vez mais rápidos e precisos.

Não há muitos antibióticos que sejam ativos para as bactérias CPE, visto estas conseguirem hidrolisar/inativar a maioria dos antibióticos  $\beta$ -Lactâmicos. Para além desse mecanismo, estas bactérias possuem outros mecanismos de resistência que fazem com que também não seja possível utilizar outras famílias de antibióticos, como as fluoroquinolonas e os aminoglicosídeos. Sendo assim, estas famílias também não são opções terapêuticas para as CPE, seja por serem ineficazes, pela relação efeito-toxicidade não ser vantajosa, ou pela resistência apresentada.

A figura 2 mostra a prevalência e os diferentes tipos de enzimas (KPC, NDM, OXA-48, VIM) responsáveis pela resistência aos Carbapenemos na Europa, com base num estudo efetuado em 2015. (14)

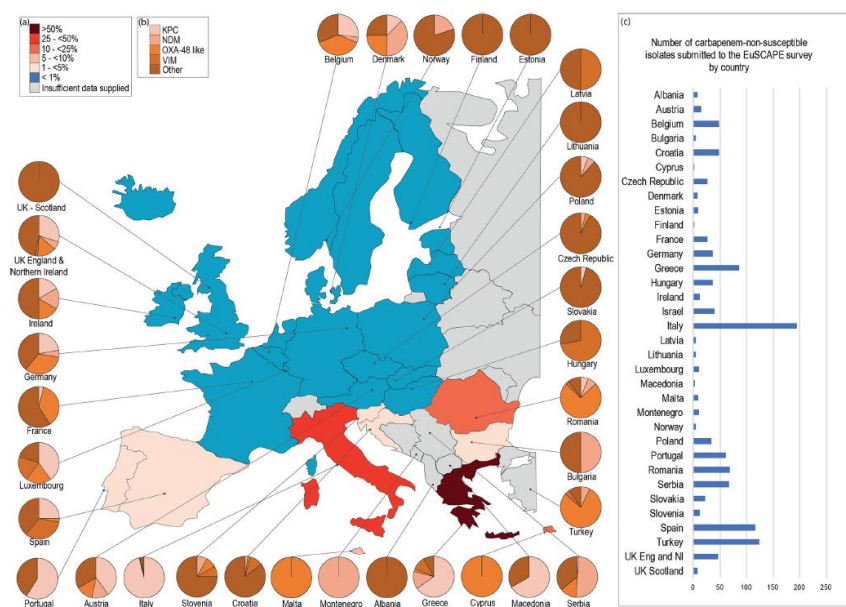


Fig. 2 – Enzimas responsáveis pela resistência aos Carbapenemos na Europa, 2015

A alínea a) da figura 2 mostra a percentagem de isolados resistentes aos Carbapenemos, determinada pelo European Centre for Disease Prevention and Control, num relatório de vigilância efetuado por esta agência, em 2015. Cada país tem uma cor que está de acordo com as gamas de percentagens apresentadas na alínea a).

A alínea b) refere-se às enzimas (KPC, NDM, OXA-48, VIM) responsáveis pela resistência aos Carbapenemos. Cada enzima está relacionada a uma cor, traduzindo-se em gráficos circulares para cada país, com a representação de cada enzima e sua percentagem.

A alínea c) reflete gráficos de barras, com o número total de isolados bacterianos de *K. pneumoniae* testados em cada país.

Conseguimos perceber que alguns países, como a Itália, Chipre e Roménia têm prevalências elevadas da resistência aos Carbapenemos (a partir de 10%). Em Portugal, Espanha, Eslovénia, Croácia e Bulgária, o nível de resistências encontra-se entre 5 a 10% dos casos. Assim, a distribuição das *Enterobacteriaceae* produtoras de Carbapenemas, é variável entre países. É então muito importante que sejam feitos

estudos de vigilância às bactérias resistentes, especialmente em meio hospitalar. Estudos que podem ser feitos por laboratórios de Microbiologia em hospitais universitários, por exemplo. (16) Além disso, com os dados obtidos nesses estudos, é mais fácil a prevenção da disseminação de bactérias resistentes e a escolha da antibioterapia mais apropriada. (17)

#### 4.2 - Bactérias Gram positivo

Dentro deste grupo destacam-se as estirpes dos géneros *Staphylococcus* e *Enterococcus*. O *Staphylococcus aureus* além de ser uma bactéria potencialmente patogénica, é resistente aos antibióticos  $\beta$ -Lactâmicos, com especial importância à meticilina, daí a abreviatura de “meticilina resistente *Staphylococcus aureus*” em MRSA.

As infeções adquiridas na comunidade estão normalmente associadas a fatores de virulência responsáveis por infeções cutâneas (por exemplo, a celulite e impetigo), e a pneumonia, endocardite e meningite, enquanto no meio hospitalar as infeções nosocomiais ou infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) estão associadas à multirresistência.

A incidência de MRSA é elevada, resultando em aumento do tempo de hospitalização, elevadas taxas de mortalidade, e originando custos incrementados de saúde. (18) A causa desta resistência é a impossibilidade dos antibióticos  $\beta$ -Lactâmicos inibirem a atividade transpeptídica da proteína de ligação à penicilina (PBP2a). É o que acontece com a meticilina, fazendo com que a síntese da parede bacteriana ocorra normalmente, não resultando em lise celular e consequente morte da bactéria. Desta maneira, é necessário procurar antibióticos alternativos, como é o caso da vancomicina, clindamicina, gentamicina, ácido fusídico, linezolid, teicoplanina e tetraciclina. (19)

Outra bactéria relevante é o *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina. Os *Enterococcus* pertencem à microbiota do sistema gastrointestinal, e habitualmente não são patogénicos. Quando o são, causam infeções urinárias, endocardite e abscessos, podendo disseminar-se a nível hospitalar. A família dos *Enterococcus* inclui a espécie *Enterococcus faecium*, que se destaca pela aquisição de resistência a várias classes de antibióticos. Devido a todos estes fatores, a OMS deu elevada prioridade ao combate dos *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina, com a necessidade de procura de opções terapêuticas eficazes e disponíveis. (20)

Na figura 3 encontramos a distribuição da resistência do *E. faecium* na Europa, em 2014. (18)

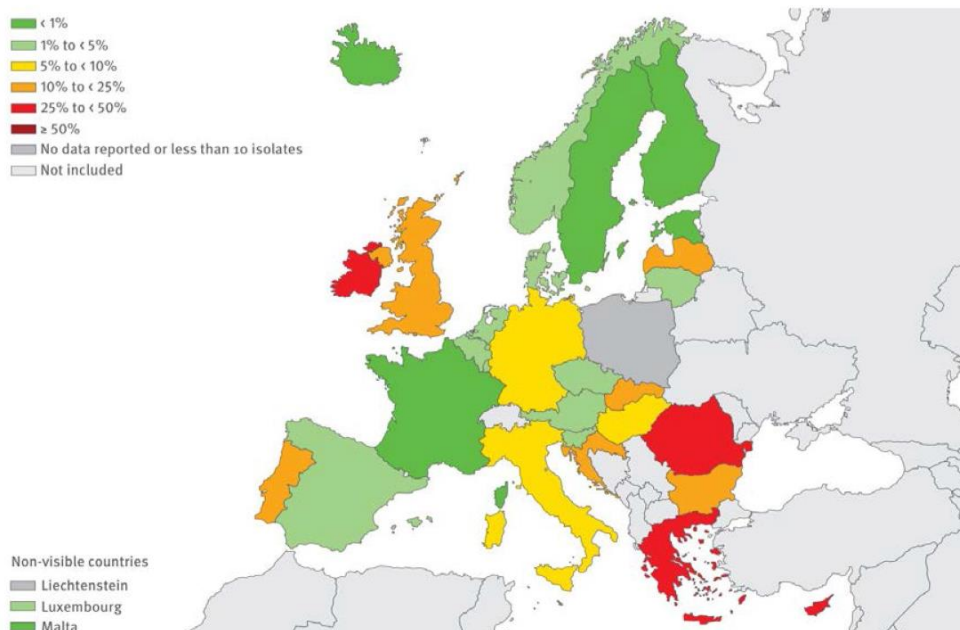


Fig. 3 – Percentagem de isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina, por país, em 2014

Países como a Roménia, Grécia e República da Irlanda têm uma incidência desta resistência muito elevada (representados a vermelho, com incidências entre 25 e 50%). Portugal, Reino Unido, Letónia, Croácia, Eslováquia, Bulgária e depois Itália, Alemanha e Hungria, são países com incidências intermédias (representados a laranja e amarelo, consecutivamente), entre 5 a 25%.

Na figura 4 é possível comparar o aumento da incidência desta bactéria em 2018. (20)

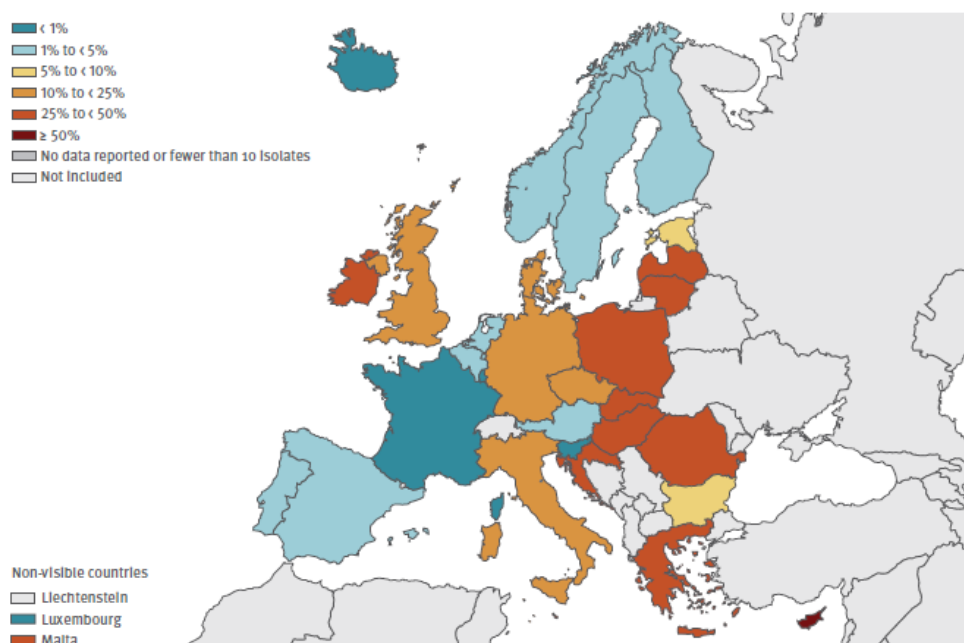


Fig. 4 – Percentagem de isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina, por país, em 2018

Por comparação entre as figuras 3 e 4, com dados de 2014 e de 2018, é possível perceber que ocorreu um aumento da resistência à vancomicina, a nível europeu. Aconteceu, sobretudo, nos países de leste, cuja disseminação desta resistência atingiu os países vizinhos.

## 5 - Métodos de identificação bacteriana e de determinação da suscetibilidade aos antibióticos

### 5.1 - Vitek 2

Um equipamento utilizado como método de identificação de rotina em muitos laboratórios é o Vitek 2. Avalia bactérias Gram positivo, na forma de cocos, e bactérias Gram negativo, na forma de bacilos. (8)

Este equipamento usa uma carta descartável, onde é colocada a suspensão bacteriana. Esta carta é única para cada amostra, e contém pelo menos um poço usado como controlo positivo (que não tem nenhum antibiótico, só serve para mostrar que o isolado bacteriano é viável), e poços que contêm concentrações crescentes de vários antibióticos.

A carta descartável necessária para efetuar os testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) está representada na figura 5.

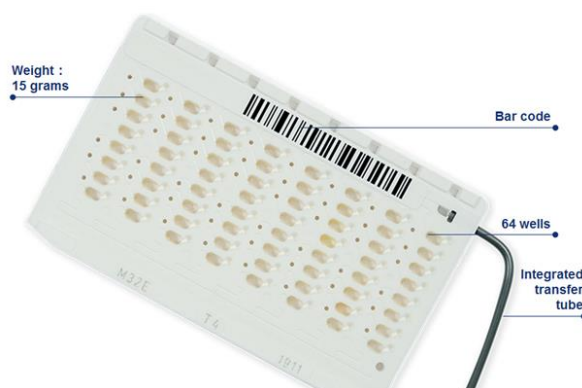


Fig. 5 – Carta descartável para TSA

O crescimento bacteriano é monitorizado continuamente em todos os poços, através da medição de turvação por fluorescência. Na figura 6 está representada a curva de crescimento bacteriano, que permite determinar a relação entre o crescimento da bactéria no poço de controlo positivo com o crescimento da bactéria em cada um dos poços com antibióticos. É de referir que o comprimento da fase de latência e o declive durante a fase exponencial são características do próprio microrganismo, e que contribuem para a identificação única.

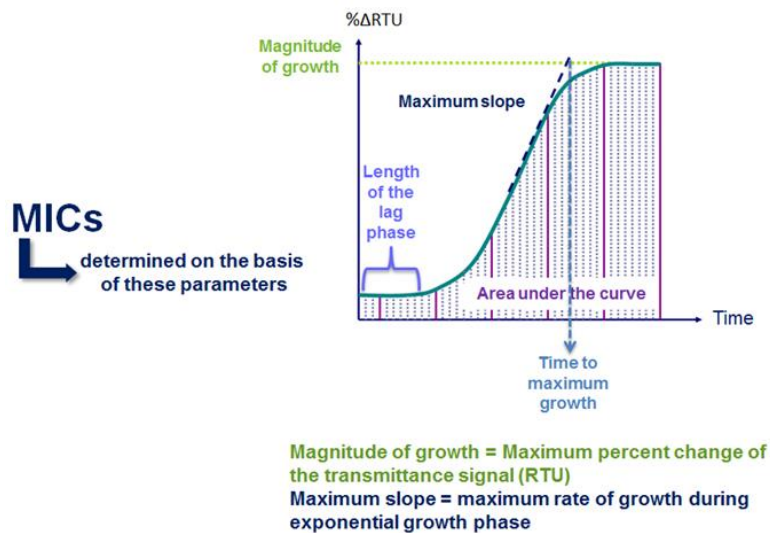


Fig. 6 – Curva de crescimento bacteriano

É possível calcular a Concentração Mínima Inibitória (CMI), que representa a concentração mínima de um antibiótico, sob condições experimentais bem definidas, capaz de inibir o crescimento de um microrganismo. O cálculo da CMI é feito pela relação entre o crescimento bacteriano do isolado com CMI's já estabelecidas de isolados padrão/referência, inseridos numa base de dados do sistema operativo do equipamento. Estão padronizados os parâmetros de referência, tanto na identificação, como nos mecanismos de resistência. Sendo assim, é possível efetuar a comparação das amostras com a maioria dos isolados padrão. Tem, também, o benefício adicional de detetar resistências tardias.

Uma vantagem do Vitek 2 em relação a outros equipamentos de rotina é a medição de inúmeros parâmetros num só isolado, sendo esta medição contínua e não apenas no final. Assim, não é necessária a utilização de poços diferentes para diferentes concentrações de um mesmo antibiótico (figura 7). (38)

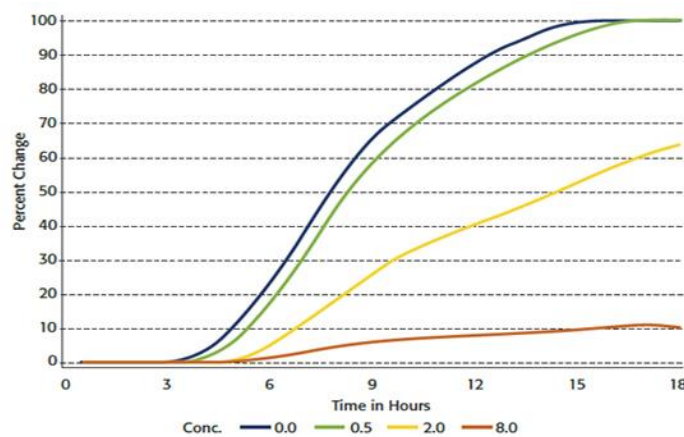


Fig. 7 – Atividade de um microrganismo com diferentes concentrações de um mesmo antibiótico

Este avanço tecnológico permite poupar espaço e é rentável, visto que a partir de um poço podemos obter informação para diferentes concentrações. Confere então, benefícios financeiros, mas também clínicos, com uma identificação bacteriana mais rápida, melhorando a terapêutica e o resultado clínico dos pacientes. Com a medição contínua, conseguimos também saber, para além da CMI, o tempo de incubação (fase de latência) necessário para cada microrganismo, pelo tempo que demora o crescimento bacteriano.

## 5.2 - Direct Rapid Antibiotic Susceptibility Test (dRAST)

Devido ao tempo que vários equipamentos demoram a dar resultados, novos métodos são concebidos, com o objetivo de originar resultados cada vez mais rápidos e precisos. O dRAST, Direct Rapid Antibiotic Susceptibility Test, projetado pela QuantaMatrix, é um deles. (3)

Semelhante ao Vitek 2, este equipamento usa painéis com poços, neste caso 96, havendo painéis específicos para bactérias Gram positivo e bactérias Gram negativo. Esta especificidade depende dos antibióticos que podem ser utilizados, 17 antibióticos para bactérias Gram positivo e 19 para bactérias Gram negativo, na maioria diferentes entre si. Nas listas seguintes é possível identificar quais os antibióticos permitidos, e em que concentrações são analisados, para cada tipo de bactérias.

### 19 Gram Negative

Antimicrobial agent	Concentration (µg/ml)	Enterobacteriaceae	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Burkholderia cepacia</i> complex	<i>S. maltophilia</i>	Other Non-Enterobacteriaceae
Amikacin	0.5, 4, 8, 16, 32	•	•	•			•
Amoxicillin/Clavulanate	2/1, 8/4, 16/8	•					
Ampicillin	1, 8, 16	•					
Ampicillin/Sulbactam	1/0.5, 8/4, 16/8	•		•			
Aztreonam	1, 2, 4, 8, 16	•	•				•
Cefazolin	0.5, 2, 4	•					
Cefepime	0.25, 1, 2, 4, 8, 16	•	•	•			•
Cefotaxime	1, 2, 4, 8, 16, 32	•		•			•
Ceftazidime	0.5, 1, 2, 4, 8, 16	•	•	•	•	•	•
Ciprofloxacin	0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2	•	•	•			•
Colistin	0.12, 2		•	•			
Ertapenem	0.5, 1, 8	•					
Gentamicin	0.25, 2, 4, 8	•	•	•			•
Imipenem	0.5, 1, 2, 4, 8	•	•	•			•
Meropenem	0.12, 1, 2, 4, 8	•	•	•	•		•
Minocycline	0.12, 1, 4, 8			•	•	•	
Piperacillin/Tazobactam	4/4, 8/4, 16/4, 32/4, 64/4	•	•	•			•
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	0.5/9.5, 2/38, 4/76	•		•	•	•	•
ESBL		•					

## 17 Gram Positive

Antimicrobial agent	Concentration (µg/ml)	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
Ampicillin	0.25, 2, 4, 8		•
Ciprofloxacin	0.12, 1, 2	•	
Clindamycin	0.03, 0.25, 0.5, 1, 2	•	
Erythromycin	0.5, 1, 2, 4	•	
Gentamicin	1, 2, 4, 8, 16	•	
Levofloxacin	0.12, 1, 2	•	
Linezolid	0.5, 2, 4	•	•
Oxacillin	0.06, 0.25, 0.5, 1, 2	•	
Penicillin	0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8	•	•
Rifampin	0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4	•	
Tetracycline	1, 2, 4, 8, 32	•	
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	0.5/9.5, 2/38, 4/76	•	
Vancomycin	0.5, 2, 4, 8, 16	•	•
Cefoxitin screen	0.5, 4, 8	•	
Gentamicin high level	128, 256, 500		•
Streptomycin high level	512, 1000		•
Inducible Clindamycin resistance	0.5/4	•	

Fig. 8 A e 8 B – listas com os antibióticos, e em que concentrações, utilizados no dRAST, para bactérias Gram positivo e Gram negativo

### Notas:

- 1) Cada antibiótico está expresso em diferentes concentrações, de forma a ser possível determinar a CMI.
- 2) Nem todas as espécies bacterianas são estudadas para todos (e para os mesmos) antibióticos, visto que na prática clínica, há antibióticos que não são efetivos para certas bactérias. Assim, torna o teste mais produtivo, evitando análises desnecessárias.
- 3) Há antibióticos comuns entre as bactérias Gram negativo e positivo, apesar de serem uma minoria, pois habitualmente o tratamento entre estes dois tipos de bactérias é diferente.

Para além de antibióticos desidratados em painéis, são usados consumíveis, que incluem um gel de agarose, para imobilizar as bactérias, e um meio de cultura, responsável pelo crescimento. O equipamento inclui um braço robótico automatizado que transfere as bactérias para o meio de cultura e adiciona os antibióticos.

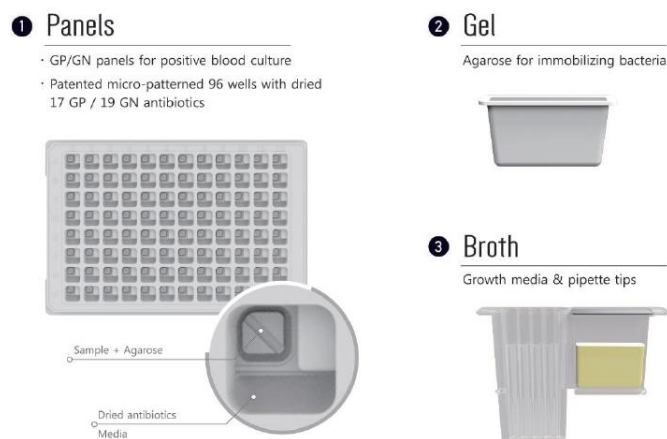


Fig. 9 – Imagem exemplificativa dos painéis, gel de agarose e meio de cultura utilizados no dRAST

A forma radial dos poços ajuda na dispersão da agarose, por efeito de capilaridade, até se formar uma matriz em forma de disco, que se estende por todo o poço. Esta matriz solidifica a temperatura ambiente (os consumíveis são guardados em câmara frigorífica até serem utilizados). Após a solidificação, a cultura bacteriana é colocada nos poços que contêm antibiótico, difundindo-se pela matriz de agarose. O sistema é colocado 6h em incubação à temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  (dentro do equipamento). (4)

O equipamento contém um sistema ótico que visualiza os poços em tempo real, registrando fotograficamente a atividade, pelo menos no tempo inicial e após as 6h. (figura 10) As imagens são utilizadas para determinar a CMI, através do cálculo da área de formação da microcolónia e criação de uma curva de crescimento. A CMI é interpretada em suscetível, intermédia ou resistente versus os valores *standard* referidos em guidelines, para cada espécie bacteriana e antibiótico estudado.

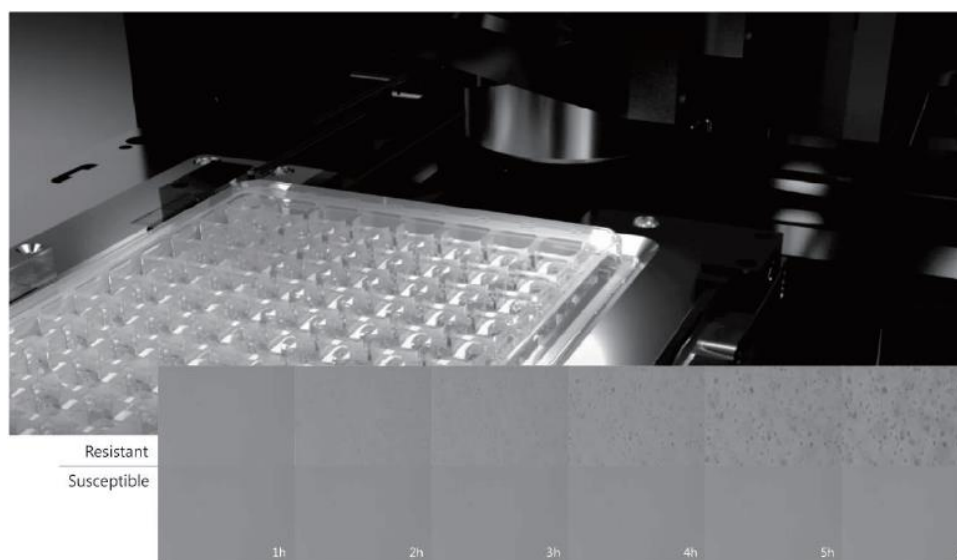


Fig. 10 – Fotografias do crescimento bacteriano em diferentes tempos (horas)

Nota: ocorrer crescimento de microcolónias significa que estas são resistentes ao antibiótico estudado, sendo que se não houver crescimento há suscetibilidade a este.

O próximo esquema descreve todo o procedimento ótico do dRAST, passo a passo. (21)

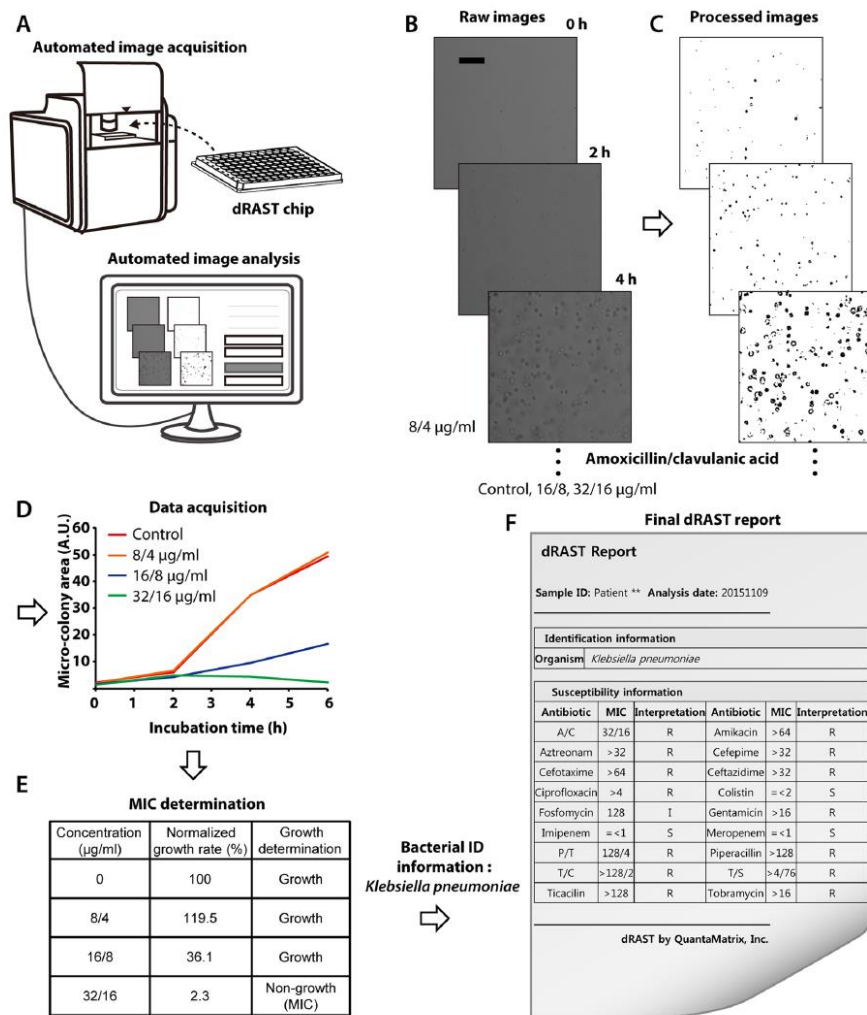


Fig. 11 – TSA automáticos com a deteção da formação de microcolónias

De acordo com a numeração da Fig.11 o processo resume-se em:

A – São tiradas fotografias automaticamente, sendo os dados transferidos para o sistema analítico.

B – Imagens de várias fotografias da *K. pneumoniae* em diferentes concentrações de amoxicilina + ácido clavulânico.

C – As fotografias de B são processadas, sendo que quanto mais destacada é a imagem, mais microcolónias estão presentes.

D – É originado um gráfico correspondente às microcolónias visíveis em C, sendo que com concentrações maiores do antibiótico, há menos formação de microcolónias.

E – É calculada a taxa de crescimento normalizada para todas as concentrações do antibiótico. Valores superiores a 20% são referidos como crescimento. Portanto, para a concentração 32/16 µg/ml, como a taxa é de 2,3%, foi considerada uma ausência de crescimento, e o valor de CMI foi determinado para essa concentração.

F- Relatório final que expõe a identificação da bactéria e os critérios de interpretação para a CMI, bem como a susceptibilidade ao antibiótico estudado.

Os métodos que testam a suscetibilidade antimicrobiana convencionais (TSA) precisam de mais tempo para processar e originar resultados. Muito devido ao facto de ser necessário preparar as amostras, realizando subculturas de isolados bacterianos, durante 18 a 24h. Para colmatar esta desvantagem, o dRAST é capaz de realizar a inoculação direta a partir das hemoculturas positivas. Assim, é possível reduzir tempo de preparação de amostras, diminuindo o tempo total necessário para obtenção de resultados, permitindo um tratamento antibiótico otimizado mais cedo. (3) (4) Por comparação, o Vitek 2 necessita de uma preparação prévia do microrganismo (subcultura) a partir da hemocultura positiva. (22)

O dRAST origina valores de CMI, como outros métodos de referência, com a diferença de necessitar de apenas 6h, após a obtenção de hemoculturas positivas, em comparação com 2 ou 3 dias para os testes convencionais. Com este método é possível encurtar 1 ou 2 dias de espera dos resultados, como está descrito nas figuras 12 e 13.

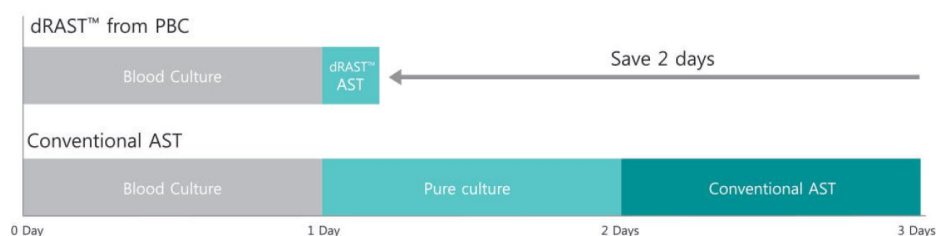


Fig. 12 – Tempo médio necessário para obter os resultados a partir dos testes de suscetibilidade a hemoculturas positivas – comparação do dRAST aos métodos convencionais

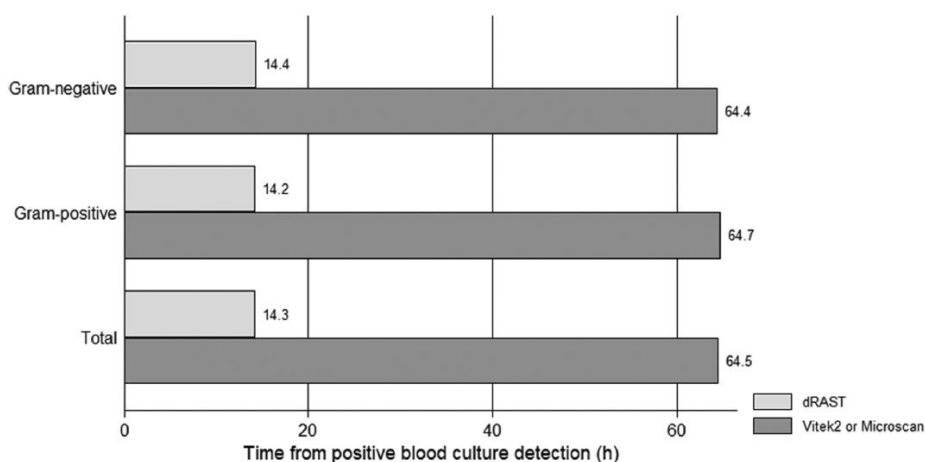


Fig. 13 – Tempo médio necessário para obter os resultados a partir dos testes de suscetibilidade a hemoculturas positivas – comparação entre bactérias Gram positivo e Gram negativo, para o dRAST e Vitek 2

Tal como o Vitek 2, o dRAST permite a análise totalmente automatizada e contínua (sem intervenção humana), exceto na colocação dos consumíveis, painéis e hemoculturas positivas, uma única etapa simples, que demora menos de 5 minutos.

O dRAST tem outras vantagens únicas: não é necessário preparar os reagentes, já vêm prontos do fabricante; o equipamento tem um sistema de controlo da temperatura; é simples de atualizar os antibióticos incluídos nos painéis; os resultados são facilmente interpretados e o equipamento pode ser usado em todo o mundo (com adaptação dos antibióticos). De cada vez, é possível analisar 12 painéis (e portanto 12 hemoculturas positivas), sendo que os resultados obtidos ficam automaticamente guardados na base de dados e acessíveis em qualquer computador com o *software* instalado.

Importa, ainda, salientar que o dRAST apresenta algumas desvantagens, visto que existem laboratórios não se encontram em funcionamento 24h/24h, e por isso, o tempo necessário até à obtenção dos resultados poderá ser superior. (3) Além disso, é necessário fazer a identificação prévia das hemoculturas positivas, quer seja usando o MALDI TOM MS ou o Vitek 2. É uma técnica mais cara, a nível do próprio equipamento, material consumível necessário e formação de pessoal. No entanto as despesas poderão ser inferiores a longo prazo. (23)

É de salientar que, através de um maior tempo de análise, deixando uma incubação por mais tempo, que permita o crescimento das colónias, seria possível obter percentagens de erro menores. Ou seja, a análise efetuada pelo dRAST demoraria mais tempo, ficando semelhante aos métodos de rotina. No entanto, aumentaria a precisão do método. (3)

### **5.3 – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS)**

Para identificação de hemoculturas positivas, existe, também, o equipamento MALDI TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. É aplicável a vários tipos de microrganismos, incluindo bactérias Gram negativo e Gram positivo.

Neste método, as colónias microbianas são colocadas em meios de cultura, cobertas com uma matriz e secas. De seguida, as placas são colocadas numa câmara de ionização, onde vai ocorrer uma aceleração em campo elétrico, levando à irradiação por um laser. Depois disso, os microrganismos são identificados através das suas proteínas, pelo tempo que demoram a passar uma distância padronizada. O tempo é traduzido em massa (específico para cada organismo), criando um espectro. O espectro é comparado com os espectros de referência, existentes na base de dados do equipamento. É feita a identificação da espécie pela percentagem de semelhança entre os dois espectros. Quanto maior for a percentagem de semelhança, mais válido e fiável é considerado um resultado. O MALDI TOF MS também pode ser utilizado para detetar resistências, através da comparação de espectros quando estes se referem à mesma espécie mas têm diferenças entre si. (24)

A figura 14 é uma representação esquemática referente ao MALDI TOF MS.

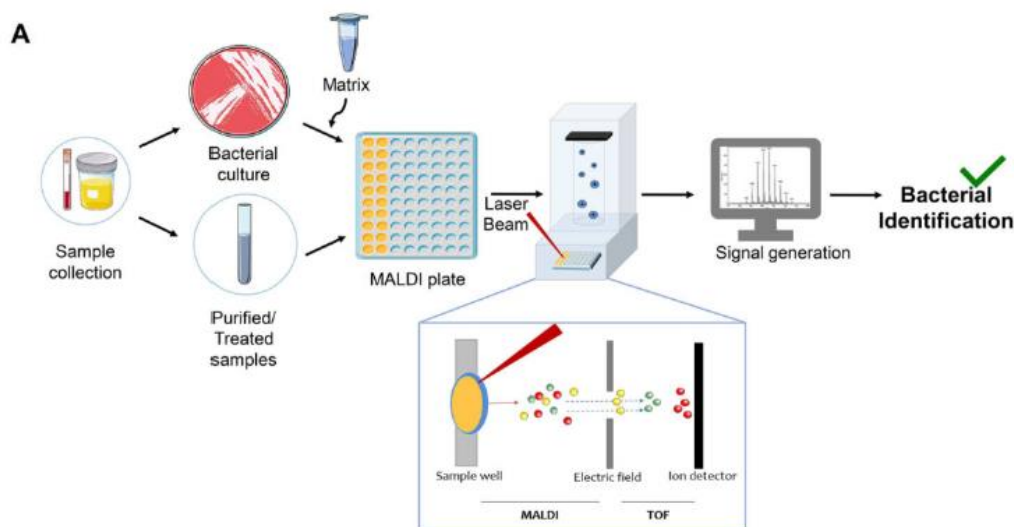


Fig. 14 – Esquema do MALDI TOF MS

Este equipamento tem como vantagens: a identificação de uma vasta gama de microrganismos e espécies; ser simples e de confiança; ser automatizado e só serem necessárias algumas células. (25) Além disso, é um método rápido visto que consegue processar até centenas de amostras. (26) Devido às inúmeras vantagens, é uma técnica largamente implementada em laboratórios de Microbiologia.

No entanto, tal como qualquer método, o MALDI TOF MS tem algumas desvantagens: o operador tem que aprender a trabalhar com o *software*; o custo de aquisição do equipamento é muito elevado (mesmo com o custo para identificação de cada isolado ser mais baixo, quando comparado com outros métodos convencionais), e pode haver erros se o operador não trabalhar com condições apropriadas de higiene, visto que se houver transferência de bactérias não patogénicas, por exemplo da pele do operador para o isolado que vai ser analisado, estas vão ser detetadas e irão interferir com o resultado final, induzindo em erro. (27)

## 6 – Objetivos

Como aluna do programa Erasmus+ estive no laboratório de Microbiologia do Hospital de Liège, com um projeto que consistia na avaliação da performance clínica do dRAST. O dRAST foi usado para realizar os testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) em hemoculturas positivas. Este projeto é parte de um estudo que abrange vários hospitais de diferentes países.

A minha formação teve como objetivos concretizados a validação da performance do dRAST, em comparação com o método de rotina Vitek 2, e também a avaliação do seu potencial clínico na gestão da terapêutica de doentes hospitalizados.

## Materiais e Métodos

### 7 – Isolados bacterianos estudados

Foram estudados isolados bacterianos de hemoculturas positivas provenientes de pacientes do hospital de Liège entre Dezembro de 2019 e Junho de 2020, que foram analisados no laboratório de Microbiologia do próprio hospital. Os pacientes, do sexo masculino e feminino, tinham diferentes idades, desde crianças a idosos.

Foram incluídas todas as hemoculturas previamente identificadas com isolados Gram negativo (na forma de bacilos) e Gram positivo (na forma de cocos), dentro das espécies permitidas pelo dRAST. Foram excluídas hemoculturas que apresentaram no Gram mais que um tipo de morfologia bacteriana ou que continham leveduras, para se poder trabalhar com uma cultura pura. Das hemoculturas analisadas, efetuou-se o estudo de 150 isolados Gram negativo e 100 isolados Gram positivo.

Os resultados foram comparados com valores do método de referência para o TSA utilizado nesta instituição, o Vitek 2, no sentido de estimar a precisão do método dRAST. A performance clínica inclui valores de CMI e interpretação em suscetível, resistente ou nível intermédio.

### 8 – Antibióticos utilizados

A avaliação da suscetibilidade bacteriana pelo dRAST foi efetuada para os seguintes antibióticos, agrupados por classes. O projeto incluiu o estudo de 13 antibióticos para cada tipo de bactéria.

Para as bactérias Gram negativo, foram usados, de acordo com a figura 15:

<b>β-Lactâmicos</b>				
ampicilina	amoxicilina + ácido clavulânico	<u>Cefalosporinas:</u> cefepime, cefotaxime e ceftazidime	<u>Carbapenemos:</u> imipenem e meropenem	piperacilina + tazobactam

<b>Quinolonas</b>	
ciprofloxacina	levofloxacina

<b>Aminoglicosídeos</b>	
amicacina	gentamicina

<b>Outros</b>
trimetoprim + sulfametoxazole

Fig. 15 – Lista correspondente aos antibióticos para os quais foram analisadas as bactérias Gram negativo

Para as bactérias Gram positivo, foram usados, de acordo com a figura 16:

<b>β-Lactâmicos</b>	ampicilina	oxacilina
<b>Lincosamidas</b>	clindamicina	
<b>Macrólidos</b>	eritromicina	
<b>Quinolonas</b>	levofloxacina	
<b>Aminoglicosídeos</b>	gentamicina	
<b>Oxazolidonas</b>	linezolid	
<b>Glicopéptidos</b>	teicoplanina	vancomicina
<b>Outros</b>	daptomicina	ácido fusídico
	rifampicina	

Fig. 16 – Lista correspondente aos antibióticos para os quais foram analisadas as bactérias Gram positivo

### 9 - Método de incubação das hemoculturas – BacT/ALERT®

Os frascos das hemoculturas devem ser transportadas diretamente da colheita para o laboratório, o mais atempadamente possível, de preferência com um atraso máximo de duas horas. A primeira etapa a realizar no laboratório é a colocação no sistema BacT/ALERT®.

O BacT/ALERT® é um sistema automático e rápido de incubação de frascos de hemocultura. Foi utilizado no dia-a-dia do laboratório de Microbiologia do Hospital de Liège. É um sistema intuitivo e fácil de usar. É composto por gavetas, com capacidade para centenas de frascos de hemoculturas. O frasco tem de ser específico para o equipamento, e contém sensores no fundo para que seja visível a mudança colorimétrica. Durante a incubação, vai ocorrer uma mudança colorimétrica irreversível com a alteração de pH, por aumento do CO<sub>2</sub> produzido pelos microrganismos. (39)



Fig. 17 – Frascos de hemoculturas utilizados no sistema BacT/ALERT® - mudança de cor caso haja a presença de um microrganismo

O sistema BacT/ALERT® mede as alterações a cada 10 minutos. Se no frasco estiver presente uma hemocultura positiva, é gerado um alerta sonoro e luminoso, visível no ecrã do equipamento, para o frasco ser retirado e serem feitas mais análises. Estes frascos são mantidos a temperatura ambiente, nunca refrigerados nem conservados no frio, pelo menos antes de serem feitas todas as análises necessárias.

Se não soar nenhum alerta até cinco dias após a colocação dos frascos de hemocultura no equipamento, o frasco é rejeitado, considerando-se “ausência de crescimento”. No entanto, em alguns casos, é necessário prolongar o tempo de incubação, por exemplo para bactérias de crescimento lento. (40)

## **10 - Métodos de identificação tradicionais**

### **10.1 - Gram**

Um dos primeiros métodos a ser realizado no laboratório é a coloração de Gram, após um isolado ser identificado como positivo pelo sistema BacT/ALERT®.

Com a coloração de Gram obtemos os primeiros resultados relativamente à natureza do microrganismo presente: levedura ou bactéria. O objetivo será decidir que carta utilizar (quer seja no Vitek 2 ou no dRAST) no que respeita o tipo de microrganismo presente. (28)

Ter em conta que com o Gram pode não ser possível detetar a presença de mais que uma espécie na mesma amostra. Só posteriormente, numa subcultura, se obterá essa informação. (8) De acordo com o resultado da coloração de Gram, e da situação clínica, o laboratório pode ligar ao médico ou à equipa responsável pelo paciente, para dar conhecimento da presença de uma bactéria Gram positivo ou Gram negativo. (29)

### **10.2 - Meios de cultura específicos para bactérias Gram positivo e Gram negativo**

Consoante o resultado do Gram, efetuou-se de seguida a sementeira para meios em gelose sólida. Estes meios são específicos para as diferentes bactérias, sendo que foram utilizados: para Gram positivo – gelose Columbia com 5% de sangue de ovelha, e para Gram negativo – gelose Mac Conkey com cristal violeta. Para espécies bacterianas específicas, ou mesmo para leveduras, são utilizados outros meios, sendo que também são diferentes no caso dos microrganismos serem aeróbios ou anaeróbios.

É feita uma incubação até o crescimento de colónias ser visível, geralmente durante 18h a 24h, a 37°C. Com a sementeira já é feita uma primeira distinção visual entre os diferentes tipos de bactérias. (8)

## 11 - Métodos de identificação e TSA automatizados

Os métodos de identificação que testam a suscetibilidade bacteriana a antibióticos (TSA) são essenciais para guiar o tratamento à bactéria que está a causar a infeção, num certo paciente. Estes métodos são baseados na deteção de resistências através do crescimento bacteriano, na presença de certos antibióticos, sendo métodos muito sensíveis. (24) Os métodos mais atuais são variações de dois métodos tradicionais, há muito implementados e usados como rotina nos laboratórios de Microbiologia. (29)

Um destes métodos é o Disk Diffusion Test, ou Teste de Kirby-Bauer, que compara pontos de corte de CMI da cultura bacteriana em análise com os pontos de corte standardizados a nível europeu, apresentados pelo EUCAST. Utiliza meios de cultura com agar Mueller-Hinton, onde é semeada a cultura bacteriana. Depois, são posicionados discos de antibióticos, separados entre si, e colocados em incubação a 35°C, por 24h. Após esse tempo, são observados halos em redor de cada antibiótico, cujo diâmetro vai ser medido, relacionado e calibrado com a CMI *standard* apresentada pelo EUCAST, originando um resultado suscetível, intermédio ou resistente. Os halos à volta de cada antibiótico caracterizam uma zona sem crescimento bacteriano, traduzindo-se na suscetibilidade da bactéria ao antibiótico testado. (30) A figura 18 inclui as zonas de inibição em redor de alguns antibióticos estudados, numa placa com crescimento bacteriano. Nos outros antibióticos que não apresentam zonas de inibição, houve crescimento bacteriano. (31)

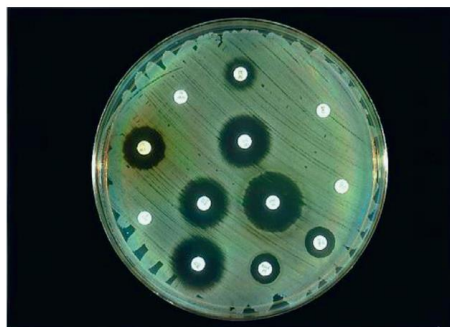


Fig. 18 – Disk Diffusion Test

Este método foi um dos primeiros a ser implementado nos laboratórios clínicos, e hoje em dia continua a ser um dos métodos mais usados. É versátil, reprodutível, preciso, simples, barato, conveniente e eficiente. (30)

Já existem variações, como o E-Test, com tiras de antibióticos em vez de discos, incluindo um gradiente de concentrações de antibiótico em cada tira. Assim, a CMI é lida diretamente na concentração onde não há crescimento bacteriano. (31)

Um Segundo método é o Sensititre Broth Micro Dilution. É feito em meio de cultura líquido, com poços contendo antibióticos em diferentes diluições. Os poços são inoculados com isolados bacterianos e colocados em incubação durante a noite a 35°C. Após a incubação, visualiza-se a presença de turvação ou sedimento, significando crescimento bacteriano. A CMI é também comparada com os pontos de corte do EUCAST. (27) Inicialmente os resultados eram observados manualmente. Atualmente

são usados instrumentos automatizados. (32) O Sensititre Broth Micro Dilution é um método de referência e conveniente. (33)

Os dois métodos anteriores têm, no entanto, algumas desvantagens, como: necessitarem de isolados bacterianos puros e cada bactéria requerer diferentes tempos de incubação. No entanto, estas desvantagens são transcendentais a outros métodos considerados de referência. (24)

## 12 - Validação dos resultados e métodos

De acordo com guidelines internacionais, existe um conjunto de regras que têm de ser cumpridas para um método poder ser validado e usado no dia-a-dia.

Escolher qual o método TSA mais apropriado depende de uma soma de importantes parâmetros: a validação dos dados; adaptabilidade e flexibilidade do método; a possibilidade de ser ou não automatizado; e o seu custo e rentabilidade. Há ainda quatro tópicos essenciais à escolha: a confiança, reprodutibilidade, exatidão e precisão do método. É essencial que os métodos produzam resultados reprodutíveis e comparáveis com os métodos *standard*, para serem usados como referência nos demais laboratórios.

Ter em conta que os microrganismos estudados num método a ser validado têm de ser isolados previamente a partir da amostra obtida, e os isolados devem ser armazenados em liofilização ou preservação criogénica (- 70°C a - 80°C), caso seja preciso usá-los numa análise futura. (34)

Terms espécies que servem de controlo é um fator primordial para conseguirmos validar os resultados que obtivemos através de um método TSA. Por isso, o dRAST usa estirpes para controlo de qualidade que validam a precisão do método e resultados. (21) Neste estudo foram utilizadas as estirpes: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. faecalis* ATCC 29212.

## 13 - Critérios de interpretação dos resultados segundo EUCAST 2020

Para a interpretação dos resultados obtidos pelo dRAST existem critérios criados por diferentes organizações. A nível europeu existe o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). O EUCAST tem uma lista de CMI standardizados e tabelados, para ser feita a comparação dos resultados obtidos em laboratório. As tabelas podem ser consultadas no *website* do EUCAST, incluindo os valores de CMI para os quais as bactérias são sensíveis, intermédias ou resistentes aos antibióticos estudados. Foi com base nestes valores, consultados no EUCAST 2020 (<https://eucast.org>), que apresentarei os meus resultados, respetiva discussão e conclusão.

De referir que existem antibióticos, como a oxacilina, que apesar de poderem ser testados, na prática clínica não constituem tratamento, sendo a sua função puramente confirmatória, neste caso dos resultados da metilina.

Outro antibiótico que requer atenção extra é a gentamicina, quando analisada para *Non-Enterobacteriaceae*. Nas tabelas disponibilizadas pelo EUCAST, em vez de aparecerem CMI numéricas, é apresentada a simbologia "IE" (insufficient evidence). Esta simbologia tem como significado a falta de evidência suficiente para que este antibiótico seja um bom antibiótico a usar nas espécies com a simbologia "IE". Geralmente os valores

obtidos em laboratório para a gentamicina têm um valor de CMI, mas sem uma descrição final no que respeita a ausência ou presença de suscetibilidade.

Outro símbolo relevante, presente em praticamente todas as tabelas do EUCAST é “ - “ em vez de valores de CMI. Significa que as espécies que possuem este símbolo não são um alvo adequado para o antibiótico a testar, podendo ser descritas *a priori* como resistentes. Pode ainda significar que este antibiótico não foi estudado, e portanto, não apresentar valores de CMI.

## Resultados, discussão e conclusão

### 14 – Espécies bacterianas permitidas

Para a validação do dRAST foi necessário diversificar as espécies incluídas no estudo, sendo que foi feita uma escolha para as espécies que seriam incluídas e em que proporção, para obtermos resultados mais abrangentes. A figura 19 A e B inclui as espécies recomendadas, estando assinaladas a negrito as que houve oportunidade de obter no laboratório. Assim, foram estudadas 11 espécies Gram negativo e 8 espécies Gram positivo.

Gram Negativo		Gram Positivo	
Permitidas	Testadas	Permitidas	Testadas
<i>Escherichia coli</i>	Sim	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sim
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sim	<i>Staphylococcus capitis</i>	Sim
<i>Enterobacter cloacae</i>	Sim	<i>Staphylococcus caprae</i>	Não
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sim	<i>Staphylococcus delphini</i>	Não
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sim	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sim
<i>Citrobacter braakii</i>	Não	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Sim
<i>Citrobacter freundii</i>	Não	<i>Staphylococcus hominis</i>	Sim
<i>Citrobacter koseri</i>	Sim	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Não
<i>Providencia spp.</i>	Sim	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Não
<i>Serratia marcescens</i>	Sim	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Não
<i>Proteus mirabilis</i>	Não	<i>Staphylococcus lutrae</i>	Não
<i>Salmonella spp.</i>	Não	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	Não
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Sim
		<i>Staphylococcus warneri</i>	Não
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sim	<i>Enterococcus faecalis</i>	Sim
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sim	<i>Enterococcus faecium</i>	Sim
<i>Burkholderia cepacia</i>	Não	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Não
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sim	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Não

Fig. 19 A e B – Listas com as espécies bacterianas permitidas no dRAST e quais foram estudadas

### 15 – Caracterização dos resultados apresentados nas tabelas

Da análise do estudo da suscetibilidade aos antibióticos, caracterizámos as bactérias de acordo com as CMI em resistente (R), suscetível (S) ou intermédia (I). A soma equivale ao número total de isolados estudados.

Na análise dos resultados foram introduzidas siglas para diferenciar os valores obtidos entre o dRAST e o Vitek 2:

- EA - Essential Agreement – existe uma diferença de  $\pm$  uma diluição dupla entre os resultados (por exemplo, 4 mg/L num método e 2 mg/L no outro);

- CA - Categorical Agreement – os valores da CMI entre o dRAST e Vitek 2 são exatamente iguais;
- DI – Different Agreements – os resultados entre os dois métodos não se enquadram nos dois parâmetros anteriores mas também originam o mesmo resultado interpretativo (suscetível, resistente ou intermédio) (por exemplo, 4 mg/L num método e 0,5 mg/L no outro);
- VMJ - Very Major Error – o resultado interpretativo no dRAST é suscetível, e para o Vitek 2 é resistente. É equivalente a uma falsa suscetibilidade;
- MAJ - Major Error – o resultado interpretativo no dRAST é resistente, e para o Vitek 2 é suscetível. É equivalente a uma falsa resistência;
- MIN - Minor Error – o resultado interpretativo no dRAST é intermédio, e para o Vitek 2 é suscetível ou resistente, ou vice-versa; (35)
- % EA / % CA / % DI / % VMJ / % MAJ / % MIN – refletem o rácio entre o valor obtido correspondente (EA, CA, DI, VMJ, MAJ ou MIN) e o valor total, em percentagem.

## **16 – Percentagens de erro aceites para os resultados**

Consoante as diferentes organizações é possível que hajam diferenças entre as percentagens de erros aceites na validação da performance de um TSA. Segundo o The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), e também de acordo com as normas da International Organization for Standardization (ISO), os Minor Errors devem ser inferiores a 10%. Já os Major Errors e Very Major Errors devem ser inferiores a 3%, tanto para isolados suscetíveis ou resistentes. (36)

A medição da precisão de um método também pode ser feita pelos valores congruentes, quando em comparação com o método de referência, e não pelas percentagens de erros. Assim, se a validação for feita de acordo com os valores congruentes, os Categorical Agreements têm que ser superiores a 90%. No entanto, a validação não é geralmente feita assim, visto que também é permitido obter outro tipo de semelhanças entre dois métodos, que não são erros.

Para este estudo foram utilizados os intervalos limite para cada tipo de erro que correspondem aos demonstrados pelo CLSI. A categoria Different Agreements foi adicionada exclusivamente neste estudo, não estando presente nas validações habituais, baseadas nas regras do CLSI.

## **17 – Tabelas com resultados referentes a bactérias Gram negativo**

Para cada tipo de bactéria são apresentadas três tabelas: uma com resultados positivos para a validação do método, outra com resultados menos bons e uma tabela total que resume as espécies analisadas para todos os antibióticos estudados. Em cada tabela estão coloridos a verde os resultados que se encontram dentro do intervalo de erros aceitável; a laranja os resultados que, apesar de se situarem fora do intervalo limite, estão perto do limiar para a validação do método; e a vermelho os resultados que estão definitivamente fora do intervalo limite aceitável para a validação do método.

Para cada antibiótico, a tabela relativa inclui espécies estudadas, sendo que foram agrupadas em famílias, como é o caso das *Enterobacteriaceae* ou dos *Staphylococcus* spp.

Em anexo estão todas as tabelas referentes ao trabalho realizado.

Tabela 1 – Estudo efetuado à ciprofloxacina para as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

		Ciprofloxacina								
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	%DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>E. coli</i>	86	11	73	2	4	16	62	0	0	4
					<b>4,65</b>	<b>18,60</b>	<b>72,09</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4,65</b>
<i>K. pneumoniae</i>	18	5	12	1	1	6	10	0	0	1
					<b>5,56</b>	<b>33,33</b>	<b>55,56</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5,56</b>
<i>P. aeruginosa</i>	15	2	0	13	7	3	5	0	0	0
					<b>46,67</b>	<b>20,00</b>	<b>33,33</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total*</b>	143	20	105	18	15	29	94	0	0	5
					<b>10,49</b>	<b>20,28</b>	<b>65,73</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,50</b>

\*o resultado para cada bactéria foi comparado com os resultados obtidos para o número total das 143 bactérias Gram negativo estudadas com a ciprofloxacina

Para a ciprofloxacina, foram analisados um total de 143 isolados das diferentes espécies Gram negativo, sendo que serão demonstradas as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, dado que apresentam resultados mais credíveis. Para as outras espécies analisadas obtivemos menos isolados e possuem resultados mais suscetíveis de modificação ao longo do tempo.

Na espécie *E. coli* foram estudados 86 isolados bacterianos, dos quais 11 são resistentes à ciprofloxacina, 73 sensíveis e 2 como nível intermédio. A maioria dos resultados foram positivos, no sentido em que obtivemos 4,65% de Essential Agreements; 18,60% de Categorical Agreements; e 72,09% de Different Agreements. Não foram obtidos Very Major Erros nem Major Errors (coloridos a verde), um excelente sinal para a validação do dRAST. Apenas obtivemos 4,65% de Minor Errors, estando dentro do intervalo aceitável para podermos validar os resultados relativamente à espécie *E. coli*, analisada para a ciprofloxacina.

Para a *K. pneumoniae*, os resultados foram, também, bastante satisfatórios no que respeita a concordância entre os dois métodos. A diferença para a espécie anterior reside numa percentagem maior de Minor Errors, mas que também está dentro do limite permitido. No entanto, como apenas foram analisados 18 isolados de *K. pneumoniae*, seria necessário efetuar mais análises, para incluir uma população mais relevante no sentido da validação do método.

Os resultados para a *P. aeruginosa* foram excelentes, visto que não foram detetados erros de qualquer tipo para a ciprofloxacina. Em contrapartida, apenas tínhamos 15 isolados desta espécie, não sendo, mais uma vez, suficiente para obter conclusões acerca da fiabilidade dos resultados.

Num total de 143 amostras analisadas, que incluem as espécies já referidas ao detalhe, e outras para as quais não serão apresentados os resultados ao pormenor, não obtivemos quaisquer Very Major ou Major Errors, conclusão indicativa da eficácia do método para a Ciprofloxacina. Apenas obtivemos 3,50% de Minor Errors, estando dentro do intervalo permitido para tornar este método válido.

Tabela 2 – Estudo efetuado à piperacilina + tazobactam para as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

Piperacilina + tazobactam										
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	%DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>E. coli</i>	83	2	80	1	70	2	7	2	0	2
					<b>84,34</b>	<b>2,41</b>	<b>8,43</b>	<b>2,41</b>	<b>0</b>	<b>2,41</b>
<i>K. pneumoniae</i>	19	0	18	1	7	0	9	1	0	2
					<b>36,84</b>	<b>0</b>	<b>47,37</b>	<b>5,26</b>	<b>0</b>	<b>10,53</b>
<i>P. aeruginosa</i>	15	0	0	15	9	0	4	0	2	0
					<b>60,00</b>	<b>0</b>	<b>26,67</b>	<b>0</b>	<b>13,33</b>	<b>0</b>
<b>Total*</b>	142	6	119	17	104	2	25	5	2	4
					<b>73,24</b>	<b>1,41</b>	<b>17,61</b>	<b>3,52</b>	<b>1,41</b>	<b>2,81</b>

\*o resultado para cada bactéria foi comparado com os resultados obtidos para o número total das 142 bactérias Gram negativo estudadas com a piperacilina + tazobactam

A piperacilina foi analisada em associação com o tazobactam, pois é geralmente utilizada na prática clínica nesta combinação, pela vantagem de originar um espectro mais alargado.

A nível das três espécies estudadas e para as quais são apresentados os resultados, os isolados utilizados, em número, são semelhantes aos utilizados para o antibiótico anterior. Para a *E. coli* obteve-se uma grande percentagem (84,34%) de Essential Agreements, sendo que todas as percentagens de erro (VMJ, MAJ e MIN) se encontram dentro dos valores permitidos. Para a espécie *K. pneumoniae*, os valores concordantes foram também elevados, com 36,84% de Essential Agreements e 47,37% de Different Agreements. No entanto, esta espécie apresenta percentagens de erro superiores ao permitido, com 5,26% de Very Major Errors (colorido a vermelho) e 10,53% de Minor Errors (colorido a laranja). Para a espécie *P. aeruginosa* obteve-se 60,00% de Essential Agreements e 26,67% de Different Agreements, valores concordantes elevados. Quanto aos erros, apenas os Major Errors se encontram numa percentagem superior ao

permitido. No geral, as percentagens de erros para *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* são muito elevadas, sendo um indicativo da inutilização deste método para a piperacilina + tazobactam com estas duas espécies.

Se considerarmos os resultados para o total de 142 espécies utilizadas, percebemos que o rácio de erros já é bastante positivo: 1,41% de Major Errors e 2,81% de Minor Errors. Apenas o correspondente aos Very Major Errors (3,52%) se encontra ligeiramente acima do permitido.

Tabela 3 – Análise efetuada aos 13 antibióticos para as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*

		TOTAL								
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>E. coli</i>	940	129	802	9	373	174	305	72	4	13
					<b>39,68</b>	<b>18,51</b>	<b>32,45</b>	<b>7,66</b>	<b>0,43</b>	<b>1,38</b>
<i>K. pneumoniae</i>	208	58	145	5	87	43	48	24	1	5
					<b>41,83</b>	<b>20,67</b>	<b>23,08</b>	<b>11,54</b>	<b>0,48</b>	<b>2,40</b>
<i>P. aeruginosa</i>	128	10	41	77	54	43	21	0	4	6
					<b>42,18</b>	<b>33,59</b>	<b>16,41</b>	<b>0</b>	<b>3,13</b>	<b>4,69</b>
<b>Total*</b>	1563	275	1188	100	620	324	443	122	23	32
					<b>39,67</b>	<b>20,73</b>	<b>28,34</b>	<b>7,81</b>	<b>1,47</b>	<b>2,05</b>

\*total de análises efetuadas às bactérias Gram negativo versus todos os antibióticos estudados

A tabela 3 temos corresponde ao total das análises efetuadas a todos os antibióticos estudados: ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, meropenem, piperacilina + tazobactam, ciprofloxacina, levofloxacina, ampicacina, gentamicina e trimetoprim + sulfametoxazole.

Os rácios de Essential Agreements para os isolados estudados no dRAST, de acordo com as espécies mais relevantes analisadas, foi de 39,68% para a *E. coli*; 41,83% para a *K. pneumoniae*; e 42,18% para a *P. aeruginosa*. No que diz respeito os Categorical Agreements, os rácios foram de 18,51% para a *E. coli*; 20,67% para a *K. pneumoniae*; e 33,59% para a *P. aeruginosa*. Relativamente aos Different Agreements, foi obtido um rácio de 32,45% para a *E. coli*; 23,08% para a *K. pneumoniae*; e 16,41% para a *P. aeruginosa*.

Para a *E. coli* e para a *K. pneumoniae* obtivemos rácios de Very Major Errors demasiado elevados, mesmo com uma amostragem bastante significativa. Relativamente à *P. aeruginosa*, o rácio de erros foi inferior ao permitido, exceto para os Major Errors (3,13%), valor que está próximo do limite.

Para as 1563 análises efetuadas obtivemos taxas de 39,67% de Essential Agreements, 20,73% de Categorical Agreements e 28,34% de Different Agreements, perfazendo um total de 88,74% (igual à soma dos três valores anteriores) de resultados concordantes, onde seria prescrito o mesmo antibiótico com base nos dois métodos. Relativamente a erros entre o dRAST e o Vitek 2, os Very Major Errors excederam o intervalo limite para o qual o método seria aceite a nível de validação. Tanto os Major como os Minor Errors se encontram com valores muito abaixo do limite permitido.

## 18 – Tabelas com resultados referentes a bactérias Gram positivo

Tabela 4 – Estudo efetuado à eritromicina para a família *Staphylococcus* spp.

dRAST vs Vitek	Eritromicina									
	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>S. aureus</i>	41	9	31	1	19	13	0	8	0	1
					<b>46,34</b>	<b>31,71</b>	<b>0</b>	<b>19,51</b>	<b>0</b>	<b>2,44</b>
<i>S. capitis</i>	2	1	0	1	0	1	0	0	0	1
					<b>0</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>50</b>
<i>S. epidermidis</i>	21	17	4	0	0	19	0	2	0	0
					<b>0</b>	<b>90,48</b>	<b>0</b>	<b>9,52</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>S. haemolyticus</i>	2	1	1	0	0	2	0	0	0	0
					<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>S. hominis</i>	8	4	4	0	2	5	0	1	0	0
					<b>25</b>	<b>62,5</b>	<b>0</b>	<b>12,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
					<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total*</b>	75	32	41	2	21	40	0	12	0	2
					<b>28,00</b>	<b>53,33</b>	<b>0</b>	<b>16,00</b>	<b>0</b>	<b>2,67</b>

\*o resultado para cada bactéria foi comparado com os resultados obtidos para o número total das 75 bactérias Gram positivo estudadas com a eritromicina

Para a eritromicina apenas foram analisadas espécies da família *Staphylococcus* spp. Em algumas destas espécies foram obtidos poucos isolados, como é o caso de *S. capitis* ou *S. haemolyticus* com apenas dois isolados cada, e *S. saprophyticus* com apenas um. Portanto, a percentagem de erros pode ser muito variável para estas espécies, sendo necessário analisar um maior número de isolados bacterianos, para obter resultados concretos e fidedignos.

Assim, para a família *Staphylococcus* spp., obtivemos 28% de Essential Agreements, valor superior quando nos referimos apenas à espécie *Staphylococcus aureus*, com 46,34% de EA. Relativamente aos Categorical Agreements, para quase todas as espécies os valores foram elevados: com 31,71% para os *Staphylococcus aureus*; 50% para *S. capitis*; 90,48% para *S. epidermidis*; 100% para *S. haemolyticus*; e 62,5% para *S. hominis*, perfazendo um total de 53,33% de CA quando calculado para todas as

espécies estudadas com a eritromicina. Em nenhuma espécie desta família foram obtidos Different Agreements.

No entanto, obtivemos 16% de Very Major Errors, percentagem muito superior ao permitido para a validação do método dRAST. Em contrapartida, não obtivemos Major Errors e apenas 2,67% de Minor Errors.

Tabela 5 – Estudo efetuado à teicoplanina para as espécies *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis* e *E. faecium*

		Teicoplanina								
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>S. aureus</i>	38	0	38	0	11	20	7	0	0	0
					<b>28,95</b>	<b>52,63</b>	<b>18,42</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Enterococcus spp.</b>	22	1	21	0	1	8	0	0	0	0
					<b>4,55</b>	<b>36,36</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>E. faecalis</i>	11	0	11	0	1	10	0	0	0	0
					<b>9,09</b>	<b>90,91</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>E. faecium</i>	11	1	10	0	9	2	0	0	0	0
					<b>81,82</b>	<b>18,18</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total*</b>	60	1	59	0	12	28	7	0	0	0
					<b>20,00</b>	<b>46,67</b>	<b>11,67</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

\*o resultado para cada bactéria foi comparado com os resultados obtidos para o número total das 60 bactérias Gram positivo estudadas com a teicoplanina

Relativamente ao antibiótico teicoplanina, foram utilizados 60 isolados das espécies *Staphylococcus aureus*, e de duas espécies de *Enterococcus spp.*: *E. faecalis* e *E. faecium*.

Quanto aos Essential Agreements entre o dRAST e o Vitek 2, estes foram de 28,95% para *Staphylococcus aureus*; 9,09% para *E. faecalis*; e 81,82% para *E. faecium*, perfazendo um total de 20,00% relativamente aos 60 isolados estudados. Obtivemos Categorical Agreements em percentagens elevadas: com 52,63% para *Staphylococcus aureus*; 90,91% para *E. faecalis*; e 18,18% para *E. faecium*, perfazendo um total de 46,67% para as três espécies estudadas. No que respeita os Different Agreements, apenas foram obtidos na espécie *Staphylococcus aureus*, com 18,42%, perfazendo 11,67% se tivermos em conta a totalidade das espécies analisadas com a teicoplanina.

Além dos resultados para este antibiótico serem bastante promissores para as concordâncias entre o dRAST e o Vitek 2, também não obtivemos erros de qualquer tipo (Very Major, Major ou Minor Errors).

Tabela 6 – Análise efetuada aos 13 antibióticos para as espécies da família *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

		TOTAL								
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<b><i>Staphylococcus</i> spp.</b>	721	131	578	12	306	236	119	31	13	16
					<b>42,44</b>	<b>32,73</b>	<b>16,50</b>	<b>4,30</b>	<b>1,80</b>	<b>2,22</b>
<i>S. aureus</i>	404	23	376	5	209	133	39	11	6	6
					<b>51,73</b>	<b>32,92</b>	<b>9,65</b>	<b>2,72</b>	<b>1,49</b>	<b>1,49</b>
<i>S. capitis</i>	18	1	16	1	4	10	2	1	0	1
					<b>22,22</b>	<b>55,56</b>	<b>11,11</b>	<b>5,56</b>	<b>0</b>	<b>5,56</b>
<i>S. epidermidis</i>	189	80	104	5	64	62	46	9	2	6
					<b>33,86</b>	<b>32,80</b>	<b>24,34</b>	<b>4,76</b>	<b>1,06</b>	<b>3,17</b>
<i>S. haemolyticus</i>	34	12	22	0	9	9	10	1	4	1
					<b>26,47</b>	<b>26,47</b>	<b>29,41</b>	<b>2,94</b>	<b>11,76</b>	<b>2,94</b>
<i>S. hominis</i>	69	14	54	1	19	20	20	7	1	2
					<b>27,54</b>	<b>28,99</b>	<b>28,99</b>	<b>10,14</b>	<b>1,45</b>	<b>2,90</b>
<i>S. saprophyticus</i>	7	1	6	0	1	2	2	2	0	0
					<b>14,29</b>	<b>28,57</b>	<b>28,57</b>	<b>28,57</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b><i>Enterococcus</i> spp.</b>	93	19	74	0	42	43	7	0	1	0
					<b>45,16</b>	<b>46,24</b>	<b>7,53</b>	<b>0</b>	<b>1,08</b>	<b>0</b>
<i>E. faecalis</i>	44	2	42	0	11	30	2	0	1	0
					<b>25,00</b>	<b>68,18</b>	<b>4,55</b>	<b>0</b>	<b>2,27</b>	<b>0</b>
<i>E. faecium</i>	49	17	32	0	31	13	5	0	0	0
					<b>63,27</b>	<b>26,53</b>	<b>10,20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total*</b>	814	150	652	12	348	279	126	31	14	16
					<b>42,75</b>	<b>34,28</b>	<b>15,48</b>	<b>3,81</b>	<b>1,72</b>	<b>1,97</b>

\*total de análises efetuadas às bactérias Gram positivo versus todos os antibióticos estudados

A tabela 6 reflete o total de espécies Gram positivo analisadas para os antibióticos: ampicilina, oxacilina, clindamicina, eritromicina, levofloxacina, gentamicina, linezolid, teicoplanina, vancomicina, daptomicina, ácido fusídico e rifampicina.

A nível de concordâncias entre os resultados obtidos para o dRAST e o Vitek 2: obtivemos 42,44% de Essential Agreements para a família dos *Staphylococcus* spp., e 45,16% para a família dos *Enterococcus* spp. Obtivemos 32,73% de Categorical Agreements para os *Staphylococcus* spp e 46,24% para os *Enterococcus* spp.; e 16,50% de Different Agreements para os primeiros, versus 7,53% para os segundos. Tanto os Essential Agreements como os Categorical Agreements se encontram com valores elevados, sendo resultados bastante positivos no que respeita a validação do dRAST.

Relativamente aos erros detetados entre os dois métodos, apenas os Very Major Errors para a família dos *Staphylococcus* spp. se encontram acima do permitido para a validação do método (4,30%). Para a família dos *Enterococcus* spp. não foram detetados erros deste tipo. Algumas das espécies de *Staphylococcus* spp., quando analisadas individualmente, apresentam VMJ em percentagens muito elevadas, principalmente as espécies *S. hominis* e *S. saprophyticus*. Porém, para esta última espécie, os resultados não são tão fiáveis, pois apenas foram feitas análises 7 vezes num total de 814. As percentagens de Major e Minor Errors, encontram-se dentro do intervalo limite de erros para considerar o dRAST fiável, com 1,80% de Major Errors para os *Staphylococcus* spp.; e 1,08% para os *Enterococcus* spp. Apenas a família dos *Staphylococcus* spp. apresentou Minor Errors (2,22%). Os resultados relativos aos *Enterococcus* spp. são, de uma maneira geral, mais promissores do que os da família dos *Staphylococcus* spp.

Um total de 814 análises a isolados bacterianos Gram positivo foram realizadas, sendo que os resultados são bastante favoráveis no que respeita a utilização do dRAST como método de referência nos laboratórios de Microbiologia. A nível de semelhança entre os resultados obtidos pelo dRAST e pelo Vitek 2, são apresentados 42,75% de Essential Agreements; 34,28% de Categorical Agreements; e 15,48% de Different Agreements, perfazendo um total de 92,51% de resultados concordantes entre os dois métodos. Portanto, os antibióticos que seriam prescritos de acordo com o resultado do dRAST seriam idênticos aos prescritos com base nos resultados do Vitek 2 em 92,51% dos casos (igual à soma dos três valores anteriores). Relativamente às discrepâncias obtidas entre o dRAST e o Vitek 2: obteve-se 3,81% de Very Major Errors; 1,72% de Major Errors; e 1,97% de Minor Errors. Apenas os VMJ estão (ligeiramente) acima do limite permitido para a validação deste método. De referir que algumas das espécies têm amostras suficientes para conclusões, mas para as restantes seria necessário a inclusão de uma população maior.

## 19 – Discussão e conclusão

As espécies apresentadas nas tabelas anteriores, para as quais foram referidos os resultados obtidos, incluem espécies consideradas como clinicamente importantes. Estas espécies são: *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp., espécies que pertencem ao grupo designado de ESKAPE. (21) A espécie *Acinetobacter baumannii*, não foi incluída nos resultados dado o número de isolados estudados ser relativamente baixo.

Os resultados descritos nas tabelas anteriormente apresentadas, bem como as colocadas em anexo, foram previamente interpretados por um médico, que comparou os resultados obtidos no dRAST com a antibioterapia efetivamente dada ao paciente, do qual foi retirada a cultura sanguínea. Mesmo que os resultados obtidos se encontrem fora dos intervalos limite referidos, o relevante é a toma de decisão por parte dos médicos no que respeita o melhor antibiótico a usar para cada caso. Ou seja, é importante perceber, se por acaso o dRAST originar um resultado erróneo, se influenciou a terapêutica instituída ou se esta se manteve correta para a bactéria presente. A interpretação médica foi concordante com os valores do dRAST, não tendo alterado nenhum resultado.

Como conclusão, é possível afirmar que os valores de CMI obtidos no dRAST são, na maioria, congruentes com os obtidos pelo Vitek 2, estando enquadrados nos intervalos

de erro permitidos pelo Controlo de Qualidade emitido pelo CLSI. Desta maneira, existe uma consistência de resultados, quando em comparação com o método *standard*. Assim, os resultados obtidos no dRAST são, na prática, possíveis de ser utilizados na determinação de uma interpretação TSA, permitindo a validação do método.

No entanto, as discrepâncias deverão ser avaliadas por um terceiro método independente, para se obter resultados reprodutíveis, no sentido de avaliar a robustez, fiabilidade e precisão do método. Infelizmente não tive oportunidade de o realizar.

Importa também demonstrar se o dRAST se aplica a todos os antibióticos e a todas as espécies, pois não foram todos estudados. Além disso, devem ser incluídas bactérias com diferentes fenótipos de resistência, ampliando a variedade microbiana analisada. É também relevante que os resultados, tanto para bactérias Gram negativo como para bactérias Gram positivo, sejam, para além de promissores e semelhantes, comparáveis ou que superem os métodos convencionais. Importa sublinhar que uma grande percentagem dos erros não deve incluir antibióticos que constituam primeiras linhas de tratamento na maioria das infeções. Além disso, seria importante avaliar economicamente a implementação deste método nos laboratórios de Microbiologia.

## Referências Bibliográficas

1. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259–72.
2. Seifert H. The Clinical Importance of Microbiological Findings in the Diagnosis and Management of Bloodstream Infections. *Clin Infect Dis*. 2009;48(s4):S238–45.
3. Kim JH, Kim TS, Song SH, Choi J, Han S, Kim DY, et al. Direct rapid antibiotic susceptibility test (dRAST) for blood culture and its potential usefulness in clinical practice. *J Med Microbiol*. 2018;67(3):325–31.
4. Kim H, Jeong HY, Han S, Han S, Choi J, Jin B, et al. Correction: Clinical Evaluation of QMAC-dRAST for Direct and Rapid Antimicrobial Susceptibility Test with Gram-Positive Cocci from Positive Blood Culture Bottles. *Ann Clin Microbiol*. 2018;21(2):45.
5. Deresinski S. Principles of Antibiotic Therapy in Severe Infections: Optimizing the Therapeutic Approach by Use of Laboratory and Clinical Data. *Clin Infect Dis*. 2007;45(Supplement\_3):S177–83.
6. Niederman MS. Appropriate use of antimicrobial agents: Challenges and strategies for improvement. *Crit Care Med*. 2003;31(2):608–16.
7. Gyssens IC. Quality measures of antimicrobial drug use. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17(1):9–19.
8. De Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol*. 2004;42(8):3734–8.
9. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(2):428–35.
10. Kollef MH. Inadequate Antimicrobial Treatment: An Important Determinant of Outcome for Hospitalized Patients. *Clin Infect Dis*. 2000;31(Supplement\_4):S131–8.
11. Sánchez Yebra W, Obelleiro Campos AX, del Gigia Aguirre L, Cabezas Fernández T, Sánchez Gómez J, de Lamo Sevilla C, et al. Preliminary readings of antimicrobial susceptibility panels: A simple, fast and inexpensive way to detect bacterial resistance and enhance antibiotic treatment of bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;94(4):398–402.
12. Journal I, Microbiology M. 4/23/2018 Hospital antibiogram: A necessity :S Joshi, *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2018;(4):1–5.
13. Bhrigu K Lahkar. The Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs. 2019;23(3):2019.
14. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb Genomics*. 2018;4(7).
15. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.
16. Turner PJ. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. 2005;41(Suppl 4):273–5.
17. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. 2017;8(4):460–9.

18. Eterna da Costa M, Machado HS. Evolution of Antimicrobial Resistance in Europe: A Factual Review. *J Allergy Ther.* 2017;08(01):1–14.
19. My NH, Hirao H, Van DU, Morokuma K. Computational studies of bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: Mechanism of covalent inhibition of the penicillin-binding protein 2a (PBP2a). *J Chem Inf Model.* 2011;51(12):3226–34.
20. Livermore DM, Macgowan AP, Wale MCJ. Surveillance of antimicrobial resistance. Vol. 317, *British Medical Journal.* 1998. 614–615 p.
21. Choi J, Jeong HY, Lee GY, Han S, Han S, Jin B, et al. Direct, rapid antimicrobial susceptibility test from positive blood cultures based on microscopic imaging analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
22. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH, Stine T, Fuhrer J, Landau W, et al. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. *J Clin Microbiol.* 1989;27(6):1342–5.
23. Doern G V., Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* 1994;32(7):1757–62.
24. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(12):2710–7.
25. Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis.* 2013;57(9):1237–45.
26. Florio W, Morici P, Ghelardi E, Barnini S, Lupetti A. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections. *Crit Rev Microbiol.* 2018;44(3):351–70.
27. Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque ACA. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends. *Biotechnol J.* 2019;14(1):1–31.
28. Gannon CK. The Gram stain. *MLO Med Lab Obs.* 2011;43(3):38.
29. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: How to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(6):513–20.
30. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(4).
31. Sandle T. Antibiotics and preservatives. *Pharm Microbiol.* 2016;171–83.
32. Chapin KC, Musgnug MC. Evaluation of Sensititre Automated Reading and Incubation System for Automated Reading of Sensititre Broth Microdilution Susceptibility Plates. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):909–11.
33. Dowzicky MJ, Nadler HL, Sheikh W. Comparison of Sensititre broth microdilution and agar dilution susceptibility testing techniques for meropenem to determine accuracy, reproducibility, and predictive values. *J Clin Microbiol.* 1994;32(9):2204–7.
34. O.I.E. Laboratory Methodologies for Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing. *OIE Terr Man.* 2012;1–11.
35. Quesada MD, Giménez M, Molinos S, Fernández G, Sánchez MD, Ravelo R, et al. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct

- identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):137–40.
36. Working S, Tests S. crossm CLSI Methods Development and Standardization Working. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4):1–10.
  37. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/core-elements/hospital.html>
  38. <https://www.biomerieux-microbio.com/como-e-que-o-vitek-2-cria-valores-de-cmi/>
  39. <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-bactalertr>
  40. <https://www.biomerieux.pt/sistemas-de-detecao-microbiana-bactalertr/>

## Anexos

São apresentados em anexo os restantes antibióticos estudados. Cada tabela corresponde a um antibiótico, com todas as espécies analisadas para o mesmo.

### 1 – Tabelas referentes a antibióticos estudados com bactérias Gram negativo

Amicacina										
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	130	5	125	0	111	10	0	4	5	0
					85,38	7,69	0	3,08	3,85	0
<i>E. coli</i>	86	3	83	0	71	9	0	3	3	0
					82,56	10,47	0	3,49	3,49	0
<i>E. aerogenes</i>	5	0	5	0	5	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7	0	7	0	6	0	0	1	0	0
					85,71	0	0	14,29	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	19	1	18	0	18	0	0	0	1	0
					94,74	0	0	0	5,26	0
<i>K. oxytoca</i>	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	1	6	0	5	1	0	0	1	0
					71,43	14,29	0	0	14,29	0
<i>Non - Enterobacteriaceae</i>	15	0	15	0	8	6	1	0	0	0
					53,33	40,00	6,67	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	15	0	15	0	8	6	1	0	0	0
					53,33	40,00	6,67	0	0	0
Total	145	5	140	0	119	16	1	4	5	0
					<b>82,07</b>	<b>11,03</b>	<b>0,69</b>	<b>2,76</b>	<b>3,45</b>	<b>0</b>

## Gentamicina

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	130	11	119	0	14	114	0	1	0	1
					10,77	87,69	0	0,77	0	0,77
<i>E. coli</i>	86	4	82	0	7	78	0	0	0	1
					8,14	90,70	0	0	0	1,16
<i>E. aerogenes</i>	5	0	5	0	0	5	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7	1	6	0	1	6	0	0	0	0
					14,29	85,71	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	19	4	15	0	4	14	0	1	0	0
					21,05	73,68	0	5,26	0	0
<i>K. oxytoca</i>	4	1	3	0	1	3	0	0	0	0
					25,00	75,00	0	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	0	7	0	0	7	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>Non - Enterobacteriaceae</i>	17	0	17	0	4	13	0	0	0	0
					23,53	76,47	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	14	0	14	0	4	10	0	0	0	0
					28,57	71,43	0	0	0	0
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>147</b>	<b>11</b>	<b>136</b>	<b>0</b>	<b>18</b>	<b>127</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
					<b>12,24</b>	<b>86,39</b>	<b>0</b>	<b>0,68</b>	<b>0</b>	<b>0,68</b>

Ampicilina										
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	127	87	40	0	103	20	1	1	2	0
					81,10	15,75	0,79	0,79	1,57	0
<i>E. coli</i>	86	47	39	0	74	11	1	0	0	0
					86,05	12,79	1,16	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	4	4	0	0	2	1	0	0	1	0
					50,00	25,00	0	0	25,00	0
<i>E. cloacae</i>	7	6	1	0	4	2	0	1	0	0
					57,14	28,57	0	14,29	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	18	18	0	0	15	3	0	0	0	0
					83,33	16,67	0	0	0	0
<i>K. oxytoca</i>	3	3	0	0	2	1	0	0	0	0
					66,67	33,33	0	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	7	0	0	4	2	0	0	1	0
					57,14	28,57	0	0	14,29	0
Total	127	87	40	0	103	20	1	1	2	0
					<b>81,10</b>	<b>15,75</b>	<b>0,79</b>	<b>0,79</b>	<b>1,57</b>	<b>0</b>

Levofloxacin										
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Non - Enterobacteriaceae</i>	15	2	3	10	3	8	3	0	1	0
					20,00	53,33	20,00	0	6,67	0
<i>P. aeruginosa</i>	12	2	0	10	1	8	2	0	1	0
					8,33	66,67	16,67	0	8,33	0
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	2	0	2	0	1	0	1	0	0	0
					50,00	0	50,00	0	0	0
Total	15	2	3	10	3	8	3	0	1	0
					<b>20,00</b>	<b>53,33</b>	<b>20,00</b>	<b>0</b>	<b>6,67</b>	<b>0</b>

### Amoxicilina + ácido clavulânico

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	131	49	82	0	57	56	2	16	0	0
					43,51	42,75	1,53	12,21	0	0
<i>E. coli</i>	86	22	64	0	37	34	2	13	0	0
					43,02	39,53	2,33	15,12	0	0
<i>E. aerogenes</i>	5	5	0	0	2	3	0	0	0	0
					40,00	60,00	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7	7	0	0	3	4	0	0	0	0
					42,86	57,14	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	20	7	13	0	11	6	0	3	0	0
					55,00	30,00	0	15,00	0	0
<i>K. oxytoca</i>	4	1	3	0	0	4	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	6	1	0	4	3	0	0	0	0
					57,14	42,86	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>49</b>	<b>82</b>	<b>0</b>	<b>57</b>	<b>56</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
					<b>43,51</b>	<b>42,75</b>	<b>1,53</b>	<b>12,21</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

### Imipenem

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Non - Enterobacteriaceae</i>	16	0	3	13	6	4	5	0	0	1
					37,50	25,00	31,25	0	0	6,25
<i>P. aeruginosa</i>	13	0	0	13	3	4	5	0	0	1
					23,08	30,77	38,46	0	0	7,69
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
					<b>37,50</b>	<b>25,00</b>	<b>31,25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6,25</b>

## Meropenem

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	130	0	130	0	126	1	3	0	0	0
					96,92	0,77	2,31	0	0	0
<i>E. coli</i>	86	0	86	0	85	0	1	0	0	0
					98,84	0	1,16	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	5	0	5	0	5	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7	0	7	0	6	0	1	0	0	0
					85,71	0	14,29	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	19	0	19	0	19	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>K. oxytoca</i>	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	0	7	0	6	1	0	0	0	0
					85,71	14,29	0	0	0	0
<i>Non - Enterobacteriaceae</i>	17	2	14	1	8	7	0	0	1	1
					47,06	41,18	0	0	5,88	5,88
<i>P. aeruginosa</i>	14	2	11	1	8	4	0	0	1	1
					57,14	28,57	0	0	7,14	7,14
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>147</b>	<b>2</b>	<b>144</b>	<b>1</b>	<b>134</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
					<b>91,16</b>	<b>5,44</b>	<b>2,04</b>	<b>0</b>	<b>0,68</b>	<b>0,68</b>

## Cefepime

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	127	16	101	10	22	9	85	0	3	8
					17,32	7,09	66,93	0	2,36	6,30
<i>E. coli</i>	84	5	75	4	15	5	62	0	0	2
					17,86	5,95	73,81	0	0	2,38
<i>E. aerogenes</i>	5	0	3	2	1	0	2	0	0	2
					20,00	0	40,00	0	0	40,00
<i>E. cloacae</i>	7	2	3	2	0	1	3	0	0	3
					0	14,29	42,86	0	0	42,86
<i>K. pneumoniae</i>	19	6	12	1	4	3	12	0	0	0
					21,05	15,79	63,16	0	0	0
<i>K. oxytoca</i>	4	0	3	1	1	0	2	0	0	1
					25,00	0	50,00	0	0	25,00
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	3	4	0	0	0	4	0	3	0
					0	0	57,14	0	42,86	0
Non - <i>Enterobacteriaceae</i>	15	3	0	12	6	4	1	0	0	4
					40,00	26,67	6,67	0	0	26,67
<i>P. aeruginosa</i>	15	3	0	12	6	4	1	0	0	4
					40,00	26,67	6,67	0	0	26,67
Total	142	19	101	22	28	13	86	0	3	12
					<b>19,72</b>	<b>9,15</b>	<b>60,56</b>	<b>0</b>	<b>2,11</b>	<b>8,45</b>

## Cefotaxima

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	129	29	98	2	4	16	103	0	4	2
					3,10	12,40	79,84	0	3,10	1,55
<i>E. coli</i>	85	11	73	1	1	9	75	0	0	0
					1,18	10,59	88,24	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	5	2	3	0	0	0	5	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7	4	3	0	1	1	3	0	2	0
					14,29	14,29	42,86	0	28,57	0
<i>K. pneumoniae</i>	19	7	11	1	1	6	11	0	0	1
					5,26	31,58	57,89	0	0	5,26
<i>K. oxytoca</i>	4	1	3	0	0	0	4	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	3	4	0	1	0	3	0	2	1
					14,29	0	42,86	0	28,57	14,29
Total	129	29	98	2	4	16	103	0	4	2
					<b>3,10</b>	<b>12,40</b>	<b>79,84</b>	<b>0</b>	<b>3,10</b>	<b>1,55</b>

## Ceftazidime

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	131	29	98	4	20	21	79	0	5	6
					15,27	16,03	60,31	0	3,82	4,58
<i>E. coli</i>	87	12	73	2	9	10	63	0	1	4
					10,34	11,49	72,41	0	1,15	4,60
<i>E. aerogenes</i>	5	2	3	0	2	0	3	0	0	0
					40,00	0	60,00	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7	3	4	0	1	5	0	0	1	0
					14,29	71,43	0	0	14,29	0
<i>K. pneumoniae</i>	19	8	10	1	7	5	6	0	0	1
					36,84	26,32	31,58	0	0	5,26
<i>K. oxytoca</i>	4	0	3	1	0	1	3	0	0	0
					0	25,00	75,00	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
					0	0	0	0	0	100
<i>S. marcescens</i>	7	3	4	0	1	0	3	0	3	0
					14,29	0	42,86	0	42,86	0
Non - <i>Enterobacteriaceae</i>	15	1	1	13	8	4	3	0	0	0
					53,33	26,67	20,00	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	15	1	1	13	8	4	3	0	0	0
					53,33	26,67	20,00	0	0	0
Total	146	30	99	17	28	25	82	0	5	6
					<b>19,18</b>	<b>17,12</b>	<b>56,16</b>	<b>0</b>	<b>3,42</b>	<b>4,11</b>

## Trimethoprim + sulfamethoxazole

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterobacteriaceae</i>	130	35	95	0	0	0	120	9	1	0
					0	0	92,31	6,92	0,77	0
<i>E. coli</i>	86	26	60	0	0	0	85	0	1	0
					0	0	98,84	0	1,16	0
<i>E. aerogenes</i>	5	0	5	0	0	0	5	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7	1	6	0	0	0	4	3	0	0
					0	0	57,14	42,86	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	19	6	13	0	0	0	13	6	0	0
					0	0	68,42	31,58	0	0
<i>K. oxytoca</i>	4	1	3	0	0	0	4	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>C. koseri</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>Providencia spp.</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	7	0	7	0	0	0	7	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
Non - <i>Enterobacteriaceae</i>	3	0	3	0	0	0	3	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	2	0	2	0	0	0	2	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
Total	133	35	98	0	0	0	123	9	1	0
					<b>0</b>	<b>0</b>	<b>92,48</b>	<b>6,77</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>

## 2- Tabelas referentes a antibióticos estudados com bactérias Gram positivo

Ampicilina										
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterococcus spp.</i>	23	12	11	0	11	11	0	0	1	0
					47,83	47,83	0	0	4,35	0
<i>E. faecalis</i>	11	1	10	0	0	10	0	0	1	0
					0	90,91	0	0	9,09	0
<i>E. faecium</i>	12	11	1	0	11	1	0	0	0	0
					91,67	8,33	0	0	0	0
Total	23	12	11	0	11	11	0	0	1	0
					<b>47,83</b>	<b>47,83</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4,35</b>	<b>0</b>

Oxacilina										
dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	75	31	44	0	25	46	3	0	1	0
					33,33	61,33	4,00	0	1,33	0
<i>S. aureus</i>	41	5	36	0	22	19	0	0	0	0
					53,66	46,34	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	21	20	1	0	1	17	2	0	1	0
					4,76	80,95	9,52	0	4,76	0
<i>S. haemolyticus</i>	4	3	1	0	1	2	1	0	0	0
					25,00	50,00	25,00	0	0	0
<i>S. hominis</i>	6	3	3	0	0	6	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
Total	75	31	44	0	25	46	3	0	1	0
					<b>33,33</b>	<b>61,33</b>	<b>4,00</b>	<b>0</b>	<b>1,33</b>	<b>0</b>

## Clindamicina

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	75	16	58	1	14	39	15	4	0	3
18,67					52,00	20,00	5,33	0	4,00	
<i>S. aureus</i>	40	2	38	0	12	26	1	1	0	0
30,00					65,00	2,50	2,50	0	0	
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
0					100	0	0	0	0	
<i>S. epidermidis</i>	21	12	8	1	0	6	12	1	0	2
0					28,57	57,14	4,76	0	9,52	
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	3	0	0	2	1	0	0	1
0					50,00	25,00	0	0	25,00	
<i>S. hominis</i>	8	1	7	0	2	3	1	2	0	0
25,00					37,50	12,50	25,00	0	0	
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>16</b>	<b>58</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>39</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
					<b>18,67</b>	<b>52,00</b>	<b>20,00</b>	<b>5,33</b>	<b>0</b>	<b>4,00</b>

## Ácido Fusídico

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	76	18	58	0	41	3	16	15	1	0
53,95					3,95	21,05	19,74	1,72	0	
<i>S. aureus</i>	41	0	41	0	34	2	0	5	0	0
82,93					4,88	0	12,20	0	0	
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	0	1	0	1	0	0
0					50,00	0	50,00	0	0	
<i>S. epidermidis</i>	21	14	7	0	4	0	13	4	0	0
19,05					0	61,90	19,05	0	0	
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	3	0	2	0	1	1	0	0
50,00					0	25,00	25,00	0	0	
<i>S. hominis</i>	7	3	4	0	1	0	2	3	1	0
14,29					0	28,57	42,86	14,29	0	
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
0					0	0	100	0	0	
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>18</b>	<b>58</b>	<b>0</b>	<b>41</b>	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
					<b>53,95</b>	<b>3,95</b>	<b>21,05</b>	<b>19,74</b>	<b>1,32</b>	<b>0</b>

### Gentamicina

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	76	14	62	0	34	7	33	2	0	0
					44,74	9,21	43,42	2,63	0	0
<i>S. aureus</i>	41	1	40	0	26	7	8	0	0	0
					63,41	17,07	19,51	0	0	0
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	0	0	2	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	21	11	10	0	8	0	12	1	0	0
					38,10	0	57,14	4,76	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	3	0	0	0	4	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>S. hominis</i>	8	1	7	0	0	0	7	1	0	0
					0	0	87,50	12,50	0	0
Total	76	14	62	0	34	7	33	2	0	0
					44,74	9,21	43,42	2,63	0	0

### Levofloxacin

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Enterococcus spp.</i>	5	4	1	0	3	2	0	0	0	0
					60,00	40,00	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	3	3	0	0	1	2	0	0	0	0
					33,33	66,67	0	0	0	0
Total	5	4	1	0	3	2	0	0	0	0
					60,00	40,00	0	0	0	0

## Linezolid

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	77	1	76	0	42	5	29	0	1	0
					54,55	6,49	37,66	0	1,30	0
<i>S. aureus</i>	41	0	41	0	18	3	20	0	0	0
					43,90	7,32	48,78	0	0	0
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	21	0	21	0	19	1	1	0	0	0
					90,48	4,76	4,76	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	3	0	0	1	2	0	1	0
					0	25,00	50,00	0	25,00	0
<i>S. hominis</i>	8	0	8	0	3	0	5	0	0	0
					37,5	0	62,5	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
<i>Enterococcus spp.</i>	23	0	23	0	14	2	7	0	0	0
					60,87	8,70	30,43	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	11	0	11	0	7	2	2	0	0	0
					63,64	18,18	18,18	0	0	0
<i>E. faecium</i>	12	0	12	0	7	0	5	0	0	0
					58,33	0	41,67	0	0	0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>99</b>	<b>0</b>	<b>56</b>	<b>7</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
					<b>56,00</b>	<b>7,00</b>	<b>36,00</b>	<b>0</b>	<b>1,00</b>	<b>0</b>

## Rifampicina

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	77	5	68	4	67	1	2	0	3	4
					87,01	1,30	2,60	0	3,90	5,19
<i>S. aureus</i>	41	2	36	3	36	0	0	0	2	3
					87,80	0	0	0	4,88	7,32
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	21	1	19	1	19	0	1	0	0	1
					90,48	0	4,76	0	0	4,76
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	3	0	3	0	0	0	1	0
					75,00	0	0	0	25,00	0
<i>S. hominis</i>	8	1	7	0	7	0	1	0	0	0
					87,50	0	12,50	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
Total	77	5	68	4	67	1	2	0	3	4
					<b>87,01</b>	<b>1,30</b>	<b>2,60</b>	<b>0</b>	<b>3,90</b>	<b>5,19</b>

## Tetraciclina

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	77	12	60	5	15	44	7	1	3	7
					19,48	57,14	9,09	1,30	3,90	9,09
<i>S. aureus</i>	41	4	36	1	11	26	0	0	2	2
					26,83	63,41	0	0	4,88	4,88
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	21	4	14	3	3	11	3	1	0	3
					14,29	52,38	14,29	4,76	0	14,29
<i>S. haemolyticus</i>	4	2	2	0	0	2	1	0	1	0
					0	50,00	25,00	0	25,00	0
<i>S. hominis</i>	8	1	6	1	1	3	2	0	0	2
					12,50	37,50	25,00	0	0	25,00
<i>S. saprophyticus</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
					0	0	100	0	0	0
Total	77	12	60	5	15	44	7	1	3	7
					<b>19,48</b>	<b>57,14</b>	<b>9,09</b>	<b>1,30</b>	<b>3,90</b>	<b>9,09</b>

## Vancomicina

dRAST vs Vitek	Total	R	S	I	EA	CA	DI	VMJ	MAJ	MIN
					% EA	% CA	% DI	% VMJ	% MAJ	% MIN
<i>Staphylococcus spp.</i>	77	3	74	0	36	31	7	0	3	0
					46,75	40,26	9,09	0	3,90	0
<i>S. aureus</i>	41	1	40	0	20	17	3	0	1	0
					48,78	41,46	7,32	0	2,44	0
<i>S. capitis</i>	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	21	1	20	0	10	8	2	0	1	0
					47,62	38,10	9,52	0	4,76	0
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	3	0	3	0	0	0	1	0
					75,00	0	0	0	25,00	0
<i>S. hominis</i>	8	0	8	0	3	3	2	0	0	0
					37,50	37,50	25,00	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
					0	100	0	0	0	0
<i>Enterococcus spp.</i>	20	2	18	0	4	16	0	0	0	0
					20,00	80,00	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	9	0	9	0	1	8	0	0	0	0
					11,11	88,89	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	11	2	9	0	3	8	0	0	0	0
					27,27	72,73	0	0	0	0
Total	97	5	92	0	40	47	7	0	3	0
					<b>41,24</b>	<b>48,45</b>	<b>7,22</b>	<b>0</b>	<b>3,09</b>	<b>0</b>