

Resistência em bactérias de Gram-positivo

Antimicrobial resistance in gram positive bacteria

Mário Ramirez*

Instituto de Microbiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

Resumo

A resistência aos antimicrobianos em bactérias de Gram-positivo é um problema de importância crescente. As espécies *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* apresentam-se cada vez mais resistentes aos antimicrobianos de primeira linha no tratamento das infecções em que são agentes etiológicos. Far-se-á uma revisão dos principais mecanismos de resistência existentes em cada uma das espécies e da sua disseminação na população bacteriana. Será discutida a evolução da proporção de estirpes resistentes em Portugal desde 1993 até 2008 e qual o seu enquadramento no contexto europeu. Discutir-se-ão as alternativas terapêuticas que mais recentemente chegaram ao mercado e qual a situação actual de resistência a estes novos fármacos.

Palavras-chave: Gram positivo, resistência aos antimicrobianos, Portugal. ☐☐

A introdução da penicilina no final dos anos 40 do século passado revolucionou o tratamento das infecções causadas por bactérias de Gram positivo, em particular as causadas por estafilococos e estreptococos. Nos mais de 60 anos que se lhe seguiram, muitos mais fármacos foram desenvolvidos para o tratamento destas infecções, sendo que as populações bacterianas têm demonstrado a sua enorme capacidade de adaptação ao desenvolver resistência a todos os agentes com que têm sido confrontadas. De entre os agentes patogénicos de Gram positivo destacam-se *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e, mais recentemente, os *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* por apresentarem problemas significativos de resistência aos agentes antimicrobianos, criando dificuldades ao nível da saúde pública e aumentando os custos dos cuidados de saúde.

Abstract

Antimicrobial resistance in Gram positive bacteria is of increasing importance. Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis are species in which resistance is escalating to the first line antimicrobials for the treatment of infections in which these species are the etiological agents. The mechanism underlying resistance in these species and their dissemination in the bacterial population will be reviewed. The data for Portugal regarding the evolution of resistance in these species from 1993 to 2008 will be presented. A discussion of these values in the European context will be provided. The alternatives offered by the new antimicrobials that just reached the market will be discussed and the data on resistance to these agents will be reviewed.

Keywords: Gram positive, antimicrobial resistance, Portugal ☐☐

Resistência aos macrólidos e à penicilina em *Streptococcus pneumoniae*.

S. pneumoniae (pneumococo) é não só o agente mais frequentemente responsável por pneumonia adquirida na comunidade, mas também de pneumonia em indivíduos residentes em lares de idosos (5). Apesar das várias armas terapêuticas disponíveis, a infecção continua associada a uma morbidade e mortalidade elevadas. Em Portugal, desde 1999 que o Estudo Viriato tem vigiado a susceptibilidade aos antimicrobianos de um conjunto de bactérias responsáveis por infecções respiratórias adquiridas na comunidade, incluindo *S. pneumoniae* (10-12).

A resistência à eritromicina nesta espécie era baixa (2 a 4%) segundo os dados dispersos existentes antes do início do Estudo Viriato. Porém, logo em 1999, a proporção de estirpes resistentes a este

* ramirez@fm.ul.pt

antimicrobiano, analisadas no âmbito desse estudo, era já 14 %. Este valor cresceu até aos 20 %, tendo-se mantido sensivelmente estável até 2008. Neste contexto é ainda importante referir que aproximadamente 80 % das estirpes resistentes à eritromicina apresentavam o fenótipo MLSB. Este fenótipo de resistência, mediado pela presença de uma metilase ribossomal, confere igualmente resistência à maioria dos restantes macrólidos, incluindo a claritromicina e a azitromicina, bem como a clindamicina.

No contexto europeu, os estudos do EARSS (<http://www.rivm.nl/earss/>) mostram que os valores portugueses estão em linha com os encontrados em Espanha, mas são inferiores a outros países mediterrânicos, como França e Itália, que apresentaram em 2007 valores superiores a 30 % de resistência à eritromicina. Ainda que no estudo EARSS apenas se estudem estirpes invasivas, ou seja estirpes isoladas de fluidos habitualmente estéreis, uma comparação com os dados mais recentes de um mesmo conjunto de estirpes em Portugal, demonstra que os valores de cerca de 20 % de resistência à eritromicina verificado no total das estirpes se mantêm se considerarmos apenas estirpes invasivas (1).

A resistência à penicilina em *Streptococcus pneumoniae* é mediada pela presença de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) alteradas, sendo que a maioria das estirpes de pneumococo resistentes à penicilina antes de 2001 apresentavam um número reduzido de tipos capsulares. Em 2001, foi introduzida em Portugal uma vacina conjugada sete valente (PCV7) dirigida contra sete dos 92 tipos capsulares expressos por *S. pneumoniae*. Os sete serotipos representados na PCV7 incluíam os serotipos que mais frequentemente apresentavam resistência à penicilina, dos quais se destacam os serotipos 9V, 14 e 23F (14).

Com o advento da vacina, não só diminuíram as infecções causadas por estes serotipos nas crianças que são o grupo alvo da vacinação, mas também se verificou uma diminuição das infecções por estes serotipos em adultos (1). A vacinação teria por isso a potencialidade de diminuir a proporção de infecções causadas por estirpes resistentes à penicilina, uma previsão que se veio a verificar nos Estados Unidos.

Em Portugal, a proporção de estirpes não susceptíveis à penicilina, considerando em conjunto as estirpes classificadas como tendo susceptibilidade intermédia (CIM 0,12-1µg/mL) e aquelas classificadas como resistentes (CIM ≥2 µg/mL), segundo as normas do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), diminuiu do período de 1999-2002 (média

23,7 %, mínimo 23,0 %, máximo 25,1 %) quando comparado com o período 2003-2007 (média 19,0 %, mínimo 17,7 %, máximo 20,5 %). Se considerarmos apenas as estirpes de resistência elevada (CIM ≥2 µg/mL) a queda foi proporcionalmente ainda maior, de 7,5 % no período de 1999-2002 para 2,0 % no período 2003-2007.

No entanto, talvez não se possa atribuir esta diminuição exclusivamente à vacinação. Quando se estudaram apenas as estirpes invasivas e se compararam os períodos pré e pós introdução da PCV7 (1), verificou-se que o decréscimo na proporção de estirpes não susceptíveis à penicilina foi mais marcado nas crianças (≤5 anos), de 45 % para 27 % (p=0,013), do que nos adultos em que não atingiu significância. Aliás, neste último grupo etário, verificou-se um aumento da proporção de estirpes simultaneamente não susceptíveis à penicilina e resistentes aos macrólidos, que passaram de 4 % para 8 % (p=0,016).

Este comportamento deve-se em parte à expansão de um clone multirresistente expressando o serotipo 19A (2), que já circulava antes da introdução da PCV7. É de notar que não se verificou a emergência de resistência em serotipos não vacinais (1). Todavia, a introdução da PCV7 em Portugal não foi acompanhada do decréscimo de estirpes resistentes que se verificou nos Estados Unidos. Na Europa, os estudos do EARSS mostram que a proporção de estirpes não susceptíveis em Portugal é semelhante à encontrada em Espanha. Os países mediterrânicos apresentam valores muito diferentes de não susceptibilidade à penicilina, sendo que em França este valor é superior a 25 % e em Itália é inferior a 10 %.

As normas do CLSI de 2008 vieram propor novas concentrações críticas para o reconhecimento de estirpes resistentes à penicilina (15). Até esta revisão, as normas em vigor desde de cerca de 1970 foram estabelecidas com o objectivo de assegurar o sucesso terapêutico em caso de meningite. A recente alteração do CLSI partiu do reconhecimento de que era possível, pela via parentérica, atingir concentrações séricas de penicilina que eram superiores às CIMs das estirpes “resistentes”, segundo as normas existentes até 2007. Vários estudos demonstraram que era possível tratar com sucesso, utilizando penicilina, as pneumonias causadas por estirpes que tinham sido classificadas como “resistentes” *in vitro*. As novas concentrações críticas propostas em 2008 têm em conta o tipo de infecção e a via de administração do antibiótico.

Quadro 1 – Concentrações críticas preconizadas pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” para a penicilina no tratamento de infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*.

| Período, infecção e via de administração | CIM µg/mL, para cada categoria | | |
|--|--------------------------------|------------|------------|
| | Susceptível | Intermédio | Resistente |
| Antes de Janeiro de 2008, qualquer infecção e via de administração | ≤0,06 | 0,12 - 1 | ≥2 |
| Desde Janeiro de 2008 | | | |
| Meningite, via endovenosa | ≤0,06 | – | ≥0,12 |
| Excepto meningite via endovenosa | ≤2 | 4 | ≥8 |
| via oral | ≤0,06 | 0,12 - 1 | ≥2 |

Esta mudança de concentrações críticas irá influenciar a nossa percepção da resistência à penicilina em *S. pneumoniae*, não só porque a CIM para classificar uma estirpe como resistente à penicilina parentérica foi aumentada para 8µg/mL, mas também porque em caso de meningite pneumocócica a CIM para considerar uma estirpe resistente baixou para 0,12 µg/mL. Para penicilina oral, que não se encontra disponível no nosso país, as concentrações críticas mantiveram-se inalteradas. A aplicação das novas concentrações críticas para a penicilina parentérica ao conjunto das estirpes, sem ter em conta aquelas que foram isoladas de líquido, fará com que a proporção de não susceptibilidade baixe para valores próximos de 1 % e com que as estirpes consideradas resistentes desapareçam.

Resistência em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Os estafilococos constituem importantes agentes patogénicos de Gram positivo, sendo responsáveis por uma grande variedade de infecções com origem na comunidade, mas também no contexto dos cuidados de saúde. Apesar de a espécie *S. aureus* permanecer a mais importante do ponto de vista clínico dentro deste grupo, não podemos esquecer os restantes estafilococos coagulase negativos. Do ponto de vista da terapêutica antimicrobiana, este último grupo apresenta problemas particulares, com taxas elevadas de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, sendo frequente a multiresistência.

A resistência à penicilina em *S. aureus* apareceu pouco depois da sua introdução na prática clínica. Ao contrário dos pneumococos, a primeira forma de resistência à penicilina encontrada em estafilococos não era devida à alteração das PBPs, mas era mediada pela presença de beta-lactamases codificadas em

plasmídeo. Com a introdução da meticilina na prática clínica em 1960, seguida de perto pelos primeiros estudos que documentaram estirpes resistentes, este cenário mudou com a emergência e disseminação de um mecanismo de resistência que é eficaz contra a quase totalidade dos beta-lactâmicos. Os *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) devem esta capacidade à presença de um elemento genético móvel, o SCC-*mec*, que contém o gene *mecA*, codificando uma PBP alternativa, a PBP2' ou PBP2a. A presença desta PBP permite a continuação da síntese do peptidoglicano, mesmo quando a meticilina está a impedir a acção das PBPs nativas.

Em Portugal, a proporção de estirpes MRSA (avaliadas pela resistência à oxacilina, uma isoxazolilpenicilina) tem-se mantido constante nos últimos 15 anos e abaixo dos 50 % (7, 9, 13), valor que se mantém quando analisamos os dados combinados de 2008 dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Centro Hospitalar do Porto e Centro Hospitalar Lisboa Norte. É de notar que há variações importantes na proporção de MRSA dependendo do hospital considerado. Por exemplo, em 2003, ainda que o valor global fosse de 47,5 %, os valores encontrados em cada hospital variaram entre 20 % e 66 % (9). Em 2008 e nos três hospitais referidos acima, a resistência à ciprofloxacina foi de 98 % e à eritromicina de 57 % (a maioria dos quais apresentava o fenótipo MLSB), mas a resistência ao co-trimoxazol e à gentamicina permanece inferior a 10 %. Esta susceptibilidade aumentada a estes dois últimos antimicrobianos contrasta com o verificado até 1997.

Um estudo realizado no Hospital Geral de Santo António documentou uma situação que poderá explicar este comportamento (3). Até ao ano 2000 havia a predominância do chamado “clone brasileiro” (ST239-III) que se caracteriza por um padrão de multiresistência que inclui a resistência ao co-trimoxazol e à gentamicina. Porém, a partir do ano 2000, este clone foi gradualmente substituído pelo clone EMRSA-15 (ST22-IV) que tem como uma das suas características a susceptibilidade a estes dois fármacos. É possível que esta substituição se tenha dado a nível nacional, o que explicaria os padrões de susceptibilidade observados.

No contexto europeu, os dados do EARSS de 2007 (<http://www.rivm.nl/earss/>), que se referem apenas a estirpes isoladas de hemoculturas, revelam uma marcada assimetria entre o norte da Europa e o sul. No norte, a resistência à meticilina é inferior a 25 %, sendo nos países escandinavos e na Holanda inferior a 5 %, enquanto nos países do sul da Europa

a resistência situa-se nos 25-50 %. A excepção a este quadro é o Reino Unido, que apresentava uma proporção de MRSA de 36 %, mais de acordo com os valores da Europa mediterrânica.

O tratamento das infecções graves por MRSA tem tradicionalmente sido feito com recurso aos glicopéptidos. Neste contexto, a detecção de MRSA com susceptibilidade diminuída à vancomicina (CIM 8µg/mL), primeiro no Japão em 1997 e seguidamente noutros países, suscitou enorme preocupação. Estas estirpes, denominadas VISA ou GISA (*S. aureus* de resistência intermédia à vancomicina ou aos glicopéptidos) apresentam alterações da composição da parede acompanhado de um seu espessamento, que se pensa serem responsáveis pela resistência. Julga-se ainda que estas estirpes estarão em desvantagem na competição com estirpes susceptíveis e por isso a sua disseminação tem sido limitada.

Entre nós, a primeira estirpe VISA foi isolada em 2006 no Hospital de S. Marcos, em Braga (4). Esta estirpe apresentava um CIM de 4µg/mL à vancomicina e parece ter emergido a partir do clone EMRSA-15 que, como referido anteriormente, estará amplamente disseminado no nosso país. A estirpe isolada em Portugal apresentava um perfil populacional de resistência homogénea, em contraste com as estirpes VISA com o mesmo contexto genético descritas anteriormente, o que parece sugerir tratar-se de uma estirpe local e não parte de um clone com uma disseminação mais alargada. Tal como é característico das estirpes VISA, a estirpe isolada em Portugal também apresentava defeitos de crescimento *in vitro*, o que poderá explicar o facto de este tipo de estirpes não se ter disseminado para além do caso descrito.

Já foram descritas estirpes de *S. aureus* resistentes (CIM>128µg/ml) à vancomicina, denominadas VRSA, identificadas pela primeira vez nos Estados Unidos em 2002. Desde então, têm sido descritos isolamentos esporádicos de estirpes VRSA, a maioria nesse país, mas também na Índia e no Irão, tendo todas em comum a presença do gene *vanA* que se supõe ter sido adquirido de enterococos. Apesar do receio que estas estirpes se viessem a disseminar rapidamente, tal não aconteceu, possivelmente devido à instabilidade genética associada ao elemento que contém o gene *vanA*. Entre nós ainda não foram descritas estirpes VRSA.

De entre os estafilococos coagulase negativos iremos abordar a evolução da resistência em *Staphylococcus epidermidis*, como exemplificativa deste grupo de microrganismos. Os estudos publicados (6,

8, 9), revelam um aumento constante da resistência à ciprofloxacina e à eritromicina em *S. epidermidis*, o que se confirma com os dados de 2008 de apenas três hospitais (Hospitais da Universidade de Coimbra, Centro Hospitalar do Porto e Centro Hospitalar Lisboa Norte).

A resistência à penicilina e aos glicopéptidos (gentamicina) tem-se mantido constante, a primeira acima dos 90 % e a segunda próximo dos 50 %. A resistência à oxacilina subiu ligeiramente desde 1997 para 2003, de cerca de 71 % para 77 %. Este valor é confirmado pelos dados mais limitados de 2008, que revelam uma proporção de estirpes resistentes de 76 %.

Resistência em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

Ao contrário das espécies referidas anteriormente, os enterococos não são agentes patogénicos primários, sendo parte da flora associada ao tubo digestivo da maioria dos indivíduos saudáveis, com a excepção de serem agentes ocasionais de infecção urinária. Recentemente, as espécies do género *Enterococcus* têm emergido como importantes agentes de infecção no contexto dos cuidados de saúde. As características de resistência aos antimicrobianos associadas ao género diminuem as opções terapêuticas para o tratamento destas infecções e podem ter contribuído para a sua crescente importância.

Todos os enterococos são resistentes à maioria das cefalosporinas e apresentam uma susceptibilidade diminuída aos aminoglicosídeos. Apresentam também alguma resistência às penicilinas (comparativamente ao género *Streptococcus* com o qual estão estreitamente relacionados), desenvolvendo tolerância muito rapidamente quando expostos a estes fármacos. A grande capacidade que este género bacteriano apresenta para efectuar trocas genéticas facilita a disseminação de elementos genéticos móveis que codificam factores que promovem a resistência adquirida a outros antimicrobianos, o que pode comprometer a eficácia das armas terapêuticas disponíveis.

A maioria das infecções no Homem é causada por *E. faecalis*, sendo que a espécie *E. faecium* apresenta maior resistência aos antimicrobianos e, por isso, inspira maiores cuidados do ponto de vista das opções terapêuticas. A resistência às aminopenicilinas em enterococos é frequentemente o resultado de um aumento da produção de uma PBP (PBP5) com baixa afinidade para os beta-lactâmicos. Já se

demonstrou a mobilização da PBP5 por transposões, o que poderá contribuir para a disseminação da resistência.

Em Portugal (6, 8, 9), à semelhança do que se verifica a nível mundial, a resistência à ampicilina é baixa em *E. faecalis* (1-2 % nos anos estudados), mas bastante mais elevada em *E. faecium*. Nesta última espécie, a resistência à amoxicilina aumentou de cerca de 70 % anteriormente ao ano 2000, para valores superiores a 80 % em 2003 (9) e superiores a 90 % nos dados mais limitados de 2008.

A resistência à estreptomina é semelhante em ambas as espécies de enterococos e tem variado entre 30 % e 50 %, com excepção do ano de 2003 (9) em que a proporção de estirpes resistentes em *E. faecium* foi de 53 %, tendo já diminuído para 44 % em 2008. A resistência aos aminoglicosídeos em enterococos é mediada pela presença de enzimas modificadoras destes antimicrobianos, codificadas por transposões que se podem localizar no cromossoma ou em plasmídios, tal como em estafilococos.

Entre nós, em *E. faecalis*, a resistência à estreptomina tem-se mantido sensivelmente constante (32-36 %) até 2003 (6, 8, 9), sendo que os dados de 2008 sugerem que possa ter havido um aumento para 47 %. O caso de *E. faecium* é substancialmente diferente. A proporção de estirpes resistentes à estreptomina manteve-se constante e próxima dos 60 % antes do ano 2000 (6, 8, 9), tendo-se verificado uma diminuição para cerca de 30 % em 2003 (9). Os dados de 2008 confirmam esta diminuição, ainda que o valor tenha aumentado em relação a 2003 para 41 % de estirpes resistentes.

A resistência à vancomicina entre nós é também bastante diferente nas duas espécies de enterococos. Enquanto em *E. faecalis* esta se manteve próximo de 1 % até 1997 tendo depois subido para 4 %, o que se mantém em 2008 (3 %), em *E. faecium* a resistência à vancomicina tem vindo a subir, de cerca de 10 % em 1994 até 32 % em 2003, sendo que o valor dos dados dos três hospitais acima referidos em 2008 (29 %) parece sugerir que terá estabilizado.

Os dados do EARSS de 2007 (<http://www.rivm.nl/earss/>) que se referem apenas a estirpes isoladas de hemoculturas, revelam que o problema da resistência aos aminoglicosídeos em *E. faecium* é comum à maioria dos países europeus, que apresentam proporções de estirpes resistentes superiores a 25 %, ou até a 50 % (Grécia e Alemanha). Quanto à resistência aos glicopéptidos, esta é bastante menor na maioria dos países europeus, sendo inferior a

10 %. Ainda assim, a Irlanda e a Grécia, tal como Portugal, apresentam valores superiores a 25 %.

Novos antimicrobianos para o combate a infecções por bactérias de Gram positivo.

A indústria farmacêutica respondeu à emergência e disseminação da resistência em bactérias de Gram positivo com o desenvolvimento de fármacos que estão agora a chegar ao mercado com a premissa de serem activos contra estirpes resistentes, tais como os MRSA ou os VRE.

O linezolid apresenta excelente actividade contra a maioria dos MRSA, apesar de já estarem descritas mutações no RNA ribossomal que reduzem a susceptibilidade dos estafilococos. O mesmo se passa com os enterococos, sobretudo associado a terapêuticas prolongadas. Apesar de estas estirpes ainda constituírem uma minoria, a sua disseminação é um risco crescente.

A daptomicina é um lipopéptido com excelente actividade contra *S. aureus*. Tem levantado alguma preocupação a associação de uma resistência diminuída a este agente entre as estirpes VISA, tal como se verificou na estirpe isolada no Hospital de S. Marcos (4). Este aumento da CIM não é, contudo, suficiente para classificar estas estirpes como resistentes. Mais preocupantes são os casos que descrevem a emergência de estirpes resistentes à daptomicina *in vivo*, levando a falência terapêutica em endocardites causadas por estirpes MRSA. No caso dos enterococos, um caso de emergência de resistência durante a terapêutica é ainda mais preocupante, dado que o CIM da daptomicina da estirpe subiu de 2 µg/mL para 32 µg/mL. Não se conhece com precisão o mecanismo de acção da daptomicina, nem os mecanismos utilizados pelas estirpes resistentes.

A tigeciclina é a primeira gliciliciclina a chegar ao mercado. Relacionada com as tetraciclinas, os mecanismos habituais de resistência a estas parecem não conferir resistência cruzada contra a tigeciclina. Entre nós, um estudo realizado no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa testou a actividade deste antimicrobiano contra estirpes recolhidas em todo o país das espécies pertencentes aos géneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* mencionadas acima. Verificou-se que a totalidade das estirpes MRSA, de estafilococos coagulase negativos e de *E. faecium* e *E. faecalis* testadas apresentavam sensibilidade a este agente.

A susceptibilidade também foi total às oxazolidinonas (quinupristina-dalfopristina) em MRSA e em estafilococos coagulase negativos. Nos enterococos, a maioria das estirpes de *E. faecalis* apresenta resistência natural à quinupristina-dalfopristina, enquanto a situação se inverteu em *E. faecium*, sendo a quase totalidade das estirpes susceptíveis a este antimicrobiano. Todavia, estudos mais alargados já documentaram resistência à tigeciclina em MRSA e estafilococos coagulase negativos, bem como a emergência de resistência durante a terapêutica numa estirpe de *E. faecalis*.

Considerações finais

As bactérias de Gram positivo têm respondido à introdução de novos antimicrobianos desenvolvendo resistência. As novas técnicas de biologia molecular têm permitido seguir a expansão e disseminação de clones resistentes, mas também documentar a transferência horizontal de elementos genéticos que conferem resistência. Ambos estes mecanismos têm sido responsáveis pelo aumento e disseminação da resistência verificada nas duas últimas décadas. A introdução de novas vacinas e o reforço das medidas de controlo de infecção poderão ajudar a controlar este importante problema.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Helena Ramos do Centro Hospitalar do Porto e à Dra. Graça Ribeiro dos Hospitais da Universidade de Coimbra o terem-me fornecido os dados referentes à resistência aos antimicrobianos de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecium* e *E. faecalis* dos seus hospitais em 2008, assim como ao Professor José Melo Cristino ter-me permitido consultar dados não publicados do Estudo Viriato, bem como ter-me facultado os dados da resistência aos antimicrobianos em 2008 do Centro Hospitalar Lisboa Norte.

Agradeço ainda, o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia, da Fundação Calouste Gulbenkian e da União Europeia para os estudos realizados no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, bem como os apoios da Glaxo SmithKline Portuguesa ao Projecto Viriato, e da Wyeth Portuguesa ao projecto POR-TEST – estudo da susceptibilidade à tigeciclina em Portugal.

Bibliografia

1. Aguiar S. I., I. Serrano, F. R. Pinto, *et al.* 2008. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine. *Clinical Microbiology and Infection* 14:835-843.
2. Aguiar S. I., F. R. Pinto, S. Nunes, *et al.* 2010. Increase of Denmark¹⁴-230 clone as a cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. *Journal of Clinical Microbiology*. *In press*
3. Amorim M. L., N. A. Faria, D. C. Oliveira, *et al.* 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2881-2888.
4. Gardete S., M. Aires-de-Sousa, A. Faustino, *et al.* 2008. Identification of the first vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolate from a hospital in Portugal. *Microbial Drug Resistance* 14:1-6.
5. Janssens J., and K. Krause. 2004. Pneumonia in the very old. *Lancet Infectious Diseases* 4:112-124.
6. Melo-Cristino J., E. Calado, I. M. Calheiros, *et al.* 1996. Estudo multicêntrico de microrganismos isolados e de resistência aos antimicrobianos em dez hospitais portugueses em 1994. *Acta Médica Portuguesa* 9:141-150.
7. Melo-Cristino J., M. L. Fernandes, N. Serrano, *et al.* 2001. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* de infecções respiratórias adquiridas na comunidade em 2000. *Acta Médica Portuguesa* 14:459-468.
8. Melo-Cristino J., and POSGAR - Portuguese Study Group of Antimicrobial Resistance. 1998. Antimicrobial resistance in staphylococci and enterococci in 10 Portuguese hospitals in 1996 and 1997. *Microbial Drug Resistance* 4:319-324.
9. Melo-Cristino J., J. M. Amorim, J. Diogo, *et al.* 2006. Estudo multicêntrico de resistência aos antimicrobianos em nove hospitais portugueses - Comparação de resultados num intervalo de uma década. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 34:6-14.
10. Melo-Cristino J., M. Ramirez, N. Serrano, *et al.* 2003. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in Portugal: results of a 3-year (1999-2001) multicenter surveillance study. *Microbial Drug Resistance* 9:73-80.
11. Melo-Cristino J., L. Santos, M. Ramirez. 2006. The Viriato Study: update of antimicrobial susceptibility data of bacterial pathogens from community-acquired respiratory tract infections in Portugal in 2003 and 2004. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 12:9-30.
12. Melo-Cristino J., N. Serrano, Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. 2003. The Viriato Study: update of antimicrobial susceptibility data of bacterial pathogens from community-acquired respiratory tract infections in Portugal in 2001 and 2002. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 9:293-310.
13. Melo-Cristino J., A. F. Alves, E. Calado. 2004. Microrganismos isolados em laboratórios hospitalares portugueses - Experiência de sete hospitais centrais. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 17:147-54.
14. Serrano I., J. Melo-Cristino, J. A. Carriço, *et al.* 2005. Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* 43:1706-1715.
15. Weinstein M. P., K. P. Klugman, R. N. Jones. 2009. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. *Clinical Infectious Diseases* 48:1596-1600.