

Artigo Original

Original Article

J. Melo-Cristino¹
Letícia Santos¹
Mário Ramirez¹
e Grupo de Estudo
Português de Bactérias
Patogénicas
Respiratórias²

Estudo Viriato: Actualização de dados de susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias responsáveis por infecções respiratórias adquiridas na comunidade em Portugal em 2003 e 2004

The Viriato Study: Update of antimicrobial susceptibility data of bacterial pathogens from community-acquired respiratory tract infections in Portugal in 2003 and 2004

Recebido para publicação/received for publication: 05.12.13
Aceite para publicação/accepted for publication: 06.01.04

Resumo

O Estudo Viriato é um estudo nacional, prospectivo e multicêntrico, de vigilância da susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias frequentemente responsáveis por infecções do aparelho respiratório adquiridas na comunidade.

Abstract

The Viriato Study is a nationwide, prospective, multicenter surveillance study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens commonly associated with community-acquired respiratory tract infections in Portugal. In 2003 and

¹ Instituto de Microbiologia. Instituto de Medicina Molecular. Faculdade de Medicina de Lisboa/Microbiology Institute. Molecular Medicine Institute Lisbon Medical School.

Av. Prof Egas Moniz 1649-028 Lisboa. Tel. 217999458. Fax. 217999459.

² Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias/Portuguese Respiratory Bacterial Pathogens Research Group: Centro Hospitalar do Alto Minho, Viana do Castelo: Sílvia Lozano; Centro Hospitalar de Cascais: Ana Fonseca, Adriana Coutinho; Centro Hospitalar de Coimbra: Ana Florinda Alves, Luís Albuquerque; Centro Hospitalar da Póvoa do Varzim/Vila do Conde: Fernando Fonseca; Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia: Paulo Lopes, Ismália Calheiros, Luísa Felício, Lourdes Sobral; Hospital do Barlavento Algarvio: Teresa Vaz, Marília Gião; Hospital Central do Funchal: Teresa Afonso; Hospital Curry Cabral, Lisboa: Maria José Silvestre, Helena Peres, Teresa Pina; Hospital Distrital de Abrantes: Clotilde Roldão; Hospital do Divino Espírito Santo, Ponta Delgada: Eulália Carvalho; Hospital Infante D. Pedro, Aveiro: Elmano Ramalheira, Ana Margarida Paradela; Hospital D. Estefânia, Lisboa: Rosa M. Barros, Maria Isabel Peres; Hospital Garcia de Orta, Almada: José Diogo, Ana Rodrigues, Isabel Nascimento; Hospital Pedro Hispano, Matosinhos: Valquíria Alves, Antónia Read, Margarida Monteiro; Hospital de Pulido Valente, Lisboa: Margarida Abecassis, Isilda Alves, Rita Pinto; Hospital dos S.A.M.S., Lisboa: Luísa Cabral, Olga Neto, Filipa Antunes; Hospital de Santa Luzia, Elvas: Ilse Fontes; Hospital de Santa Maria, Lisboa: Luís Lito, Maria Luís Fernandes, Maria José Salgado; Hospital de Santa Marta, Lisboa: Margarida Pinto, Herminia Choon; Hospital de Santo António, Porto: Ana Paula Castro, Maria Helena Ramos, José Manuel Amorim; Hospital de São Francisco Xavier, Lisboa: Filomena Martins, Maria Ana Pessanha, Elsa Gonçalves; Hospital de São João, Porto: Fernanda Cotta, J. Correia da Fonseca; Hospital de São José, Lisboa: Maria Odete Spencer, João Marques; Hospital de São Marcos, Braga: Maria Alberta Faustino, Adelaide Alves; Hospital de São Teotónio, Viseu: Isabel Marques, José Miguel Ribeiro; Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães: Ana Paula M. Vieira, Francisco B. Moniz; Hospitais da Universidade de Coimbra: Rosa Velho, Rui Tomé, Celeste Pontes; Hospital de Vila Real: Ana Paula Castro; Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto: M^a. Olinda Basílio, M^a da Graça Martins, Cristiana Pereira, Engrácia Raposo, Maria de Lurdes Magalhães, Helena Rocha.

Nos anos de 2003 e 2004 participaram 29 laboratórios de todo o país. Isolaram-se 2945 microrganismos que foram estudados num laboratório coordenador. Das 513 estirpes de *Streptococcus pyogenes* de doentes com amigdalofaringite aguda, todas eram susceptíveis à penicilina e outros antibióticos beta-lactâmicos, mas 18,9% eram resistentes à eritromicina, claritromicina e azitromicina. Nas estirpes resistentes foi mais frequente o fenótipo M (67,0%) que confere resistência à eritromicina (CIM₉₀=16 mg/L), claritromicina e azitromicina, mas susceptibilidade à clindamicina (CIM₉₀=0,094 mg/L). De doentes com infecção do aparelho respiratório inferior estudaram-se 1300 estirpes de *Streptococcus pneumoniae* (pneumococos), 829 de *Haemophilus influenzae* e 303 de *Moraxella catarrhalis*. Em *S. pneumoniae*, 18,4% das estirpes eram resistentes à penicilina (3,5% com resistência elevada), 7,1% à cefuroxima, 0,5% à amoxicilina, 0,5% à amoxicilina/clavulanato, 18,8% à eritromicina, claritromicina e azitromicina, 14,5% à tetraciclina, 16,5% ao co-trimoxazol e 0,4% à levofloxacina. Nas estirpes resistentes aos macrólidos, dominou o fenótipo MLS_B (83,7%), caracterizado por resistência elevada (CIM₉₀ > 256 mg/L) à eritromicina, claritromicina, azitromicina e clindamicina. Produziam beta-lactamase 10,0% de *H. influenzae* e 96,4% de *M. catarrhalis*. Em *H. influenzae* demonstrou-se 5,5% de resistência à claritromicina e 13,4% ao co-trimoxazol. A quase totalidade das estirpes era susceptível à amoxicilina / clavulanato, cefuroxima, azitromicina, tetraciclina e ciprofloxacina. Em *M. catarrhalis* a resistência ao co-trimoxazol foi de 27,1% e à tetraciclina de 1,0%. Todas as estirpes eram susceptíveis à amoxicilina / clavulanato, cefuroxima, claritromicina, azitromicina e ciprofloxacina. De entre o conjunto de antibióticos ensaiado, a penicilina continua a ser o mais activo

2004 a total of 2945 isolates was recovered in the 29 laboratories that participated in the study. Testing was undertaken in a central laboratory. Of the 513 *Streptococcus pyogenes* strains isolated from patients with acute tonsillitis all were susceptible to penicillin and other beta-lactams but 18.9% were resistant to erythromycin, clarithromycin and azithromycin. The M phenotype dominated (67%), conferring resistance to erythromycin (MIC₉₀=16mg/L), clarythromycin and azithromycin, but susceptibility to clindamycin (MIC₉₀=0.094 mg/L). From patients with lower respiratory tract infection 1,300 strains of *Streptococcus pneumoniae*, 829 of *Haemophilus influenzae*, and 303 of *Moraxella catarrhalis* were studied. Among *S. pneumoniae* isolates 18.4% were resistant to penicillin (3.5% showing high-level resistance), 7.1% to cefuroxime, 0.5% to amoxicillin and amoxicillin/clavulanate, 18.8% to erythromycin, clarithromycin and azithromycin, 14.9% to tetracycline, 16.5% to co-trimoxazol, and 0.4% to levofloxacin. Beta-lactamases were produced by 10.0% of *H. influenzae* and 96.4% of *M. catarrhalis*. In *H. influenzae* resistance to clarithromycin was 5.5% and to co-trimoxazole was 13.4%. Most strains were susceptible to amoxicillin/clavulanate, cefuroxime, azithromycin, tetracycline and ciprofloxacin. In *M. catarrhalis* resistance to co-trimoxazole was 27.1% and to tetracycline 1.0%. All strains were susceptible to amoxicillin/clavulanate, cefuroxime, clarithromycin, azithromycin and ciprofloxacin. Penicillin was the most active antimicrobial agent against *S. pyogenes* and amoxycillin / clavulanate and the quinolones the most active *in vitro* simultaneously against *S. pneumoniae*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis*.

Rev Port Pneumol 2006; XII (1): 9-29

contra *S. pyogenes* e a amoxicilina / clavulanato e as quinolonas os mais activos simultaneamente contra *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*.

Rev Port Pneumol 2006; XII (1): 9-29

Palavras-chave: Portugal, Estudo Viriato, infecção respiratória, comunidade, 2003, 2004, susceptibilidade aos antimicrobianos, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*.

Key-words: Portugal, Viriato Study, respiratory tract infections, community, 2003, 2004, antimicrobial resistance, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*.

Introdução

O Estudo Viriato é um estudo nacional, prospectivo e multicêntrico, de vigilância da susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias frequentemente responsáveis por infecções do aparelho respiratório adquiridas na comunidade, a saber: *Streptococcus pyogenes* (apenas estirpes isoladas de amigdalofaringites), *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*), *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (estirpes isoladas do aparelho respiratório inferior ou do sangue de doentes com diagnóstico de pneumonia). O estudo foi iniciado em 1999 e conta com a participação de cerca de 30 laboratórios do País. Os resultados referentes aos anos de 1999 a 2002 foram já apresentados em publicações anteriores^{1,2,3}. No presente texto actualiza-se a informação disponível

Introduction

The Viriato Study is a nationwide, prospective, multi-centre monitoring of the antimicrobial susceptibility of the bacterial pathogens commonly responsible for community-acquired respiratory tract infections, to wit, *Streptococcus pyogenes* (only strains isolated from tonsillitis/pharyngitis), *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*), *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* (strains isolated from the lower respiratory tract or the blood of pneumonia-diagnosed patients). The study began in 1999, with around 30 national laboratories taking part. The 1999-2002 results have already been shown in earlier publications^{1,2,3}. This article updates the available information and discusses the results, placing a greater emphasis on 2003 and 2004.

O Estudo Viriato foi iniciado em 1999 e conta com a participação de cerca de 30 laboratórios do país

Como estudo de vigilância da susceptibilidade bacteriana, procura contribuir para o conhecimento dos valores nacionais de resistência aos antimicrobianos mais frequentemente prescritos

e discutem-se os resultados, com maior ênfase nos anos de 2003 e 2004. Como estudo de vigilância da susceptibilidade bacteriana, o Estudo Viriato procura contribuir para o conhecimento dos valores nacionais de resistência aos antimicrobianos mais frequentemente prescritos em Portugal no tratamento empírico das infecções respiratórias adquiridas na comunidade, acompanhando ainda a evolução das resistências mais significativas em cada uma das espécies bacterianas incluídas.

Material e métodos

Laboratórios participantes

Nos anos 2003 e 2004 participaram no estudo 29 laboratórios de bacteriologia de todo o país, de acordo com a seguinte distribuição: *Zona Norte*: Centro Hospitalar do Alto Minho, Viana do Castelo; Centro Hospitalar da Póvoa de Varzim e Vila do Conde, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia; Hospital Pedro Hispano, Matosinhos; Hospital de Santo António, Porto; Hospital de São João, Porto; Hospital de São Marcos, Braga; Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães; Hospital de Vila Real e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto. *Zona Centro*: Centro Hospitalar de Coimbra; Hospital Distrital de Abrantes; Hospital Infante D. Pedro, Aveiro; Hospital de São Teotónio, Viseu; e Hospitais da Universidade de Coimbra. *Zona Sul e Ilhas*: Centro Hospitalar de Cascais; Hospital do Barlavento Algarvio; Hospital Cruz de Carvalho, Funchal; Hospital Curry Cabral, Lisboa; Hospital do Divino Espírito Santo, Ponta Delgada; Hospital

The Viriato Study monitors bacterial susceptibility, aiming to add to the national picture of resistance to the antimicrobials used most frequently in the empirical treatment of community acquired respiratory infections in Portugal. The Study also seeks to chart the more significant resistance in each of the bacteria species studied.

Material and methods

Participating laboratories

29 Bacteriological Laboratories across Portugal took part in the study in 2003 and 2004. Their geographical spread was as follows. *North*: Hospital Centre, Viana do Castelo; Póvoa de Varzim and Vila do Conde Centro Hospital Centre, Vila Nova de Gaia Hospital Centre; Pedro Hispano Hospital, Matosinhos; Santo António Hospital, Porto; São João Hospital, Porto; São Marcos Hospital, Braga; Senhora da Oliveira Hospital, Guimarães, Vila Real Hospital and Dr. Ricardo Jorge National Institute of Health, Porto. *Centre*: Coimbra Hospital Centre; Abrantes District Hospital; Infante D. Pedro Hospital, Aveiro; São Teotónio Hospital, Viseu and Coimbra University Hospitals. *South and Islands*: Cascais Hospital Centre; Barlavento Hospital Algarve; Cruz de Carvalho Hospital, Funchal; Curry Cabral Hospital, Lisbon; Divino Espírito Santo Hospital, Ponta Delgada; D. Estefânia Hospital, Lisbon; Garcia de Orta Hospital, Almada; Pulido Valente Hospital, Lisbon; S.A.M.S. Hospital, Lisbon; Santa Luzia Hospital, Elvas; São Francisco Xavier Hospital, Lisbon; São José Hospital, Lisbon, Santa Maria Hos-

D. Estefânia, Lisboa; Hospital Garcia de Orta, Almada; Hospital Pulido Valente, Lisboa; Hospital dos SAMS, Lisboa; Hospital de Santa Luzia, Elvas; Hospital de São Francisco Xavier, Lisboa; Hospital de São José, Lisboa; Hospital de Santa Maria, Lisboa; e Hospital de Santa Marta, Lisboa. As estirpes isoladas nos 29 laboratórios foram enviadas para o centro coordenador, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, onde se efectuaram todos os restantes estudos.

Bactérias estudadas e critérios de inclusão

Incluíram-se no estudo estirpes de *S. pyogenes* isoladas de exsudados faríngeos de doentes com diagnóstico de amigdalite aguda e estirpes de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis* isoladas de produtos do aparelho respiratório (expectoração, secreções brônquicas e lavados broncoalveolares) ou do sangue de doentes com diagnóstico clínico de infecção do aparelho respiratório inferior adquirida na comunidade. No caso de expectoração e secreções brônquicas, sugeriu-se um rastreio prévio da qualidade das amostras, baseado na presença de células epiteliais, neutrófilos e morfologia das bactérias predominantes^{4,5}.

Todos os microrganismos foram isolados de doentes em ambulatório ou, se hospitalizados, apenas incluídos quando a colheita foi feita nas primeiras 48 horas de internamento. Excluíram-se as amostras duplicadas e as provenientes de doentes com diagnóstico de fibrose quística.

pital, Lisbon and Santa Marta Hospital, Lisbon.

The strains isolated at the 29 laboratories were sent to the coordinating centre at the Lisbon University School of Medicine Microbiology Laboratory where the rest of the studies were carried out.

Bacteria studied and inclusion criteria

The following were part of the study:

Streptococcus pyogenes strains isolated from the pharyngeal secretions of patients with acute tonsillitis and *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*), *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* strains isolated from products of the respiratory system (expectoration, bronchial secretions and bronchoalveolar lavage) or the blood of patients clinically diagnosed with community acquired lower respiratory system infection. Expectations and bronchial secretions came as samples from a prior sweep, based on the presence of epithelial cells, neutrophils and the morphology of the predominant bacteria^{4,5}.

All the microorganisms were isolated from out-patients, in-patients only being included if the sample was taken within the first 48 hours of admittance. Duplicate samples and samples from cystic fibrosis diagnosed patients were excluded from the study.

Identification of the strains

The strains were identified in the participating laboratories using methods which were routine to each one, then sent to the coordinating laboratory. Here they were kept at -70°C until they were analysed. Identification was confirmed using the following tests. For *Streptococcus pyogenes*,

Todos os microrganismos foram isolados de doentes em ambulatório ou, se hospitalizados, apenas incluídos quando a colheita foi feita nas primeiras 48 horas de internamento

Identificação das estirpes

As estirpes foram identificadas nos laboratórios participantes pelos métodos existentes na rotina de cada um e enviadas posteriormente para o laboratório coordenador, onde se conservaram a -70°C até serem estudadas. A confirmação da identificação fez-se utilizando as seguintes provas: *S. pyogenes*, morfologia das colónias, hemólise beta em gelose sangue-de-cavalo e identificação no grupo A de Lancefield recorrendo a prova de aglutinação em látex comercializada (Slidex Strepto A, bioMérieux®); *S. pneumoniae*, morfologia das colónias, susceptibilidade à optoquina e, ocasionalmente, solubilidade em bÍlis; *H. influenzae*, morfologia das colónias e necessidade dos factores X e V; *M. catarrhalis*, morfologia das colónias, produção de oxidase, produção de DNase e, ocasionalmente, utilização do sistema comercializado API NH (bioMérieux®).

Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi efectuada com discos contendo concentrações adequadas de antimicrobianos, por difusão em agar, de acordo com as recomendações do NCCLS⁶. Os antimicrobianos ensaiados foram penicilina (apenas *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*), ampicilina (*H. influenzae* e *M. catarrhalis*), amoxicilina (*S. pneumoniae*), amoxicilina/clavulanato, cefuroxima, eritromicina, claritromicina, azitromicina, tetraciclina, clindamicina (*S. pyogenes* e *S. pneumoniae*), co-trimoxazol (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*), cloranfenicol (*S. pneumoniae*), levofloxacina (*S. pyogenes* e *S. pneumoniae*) e ciprofloxacina (*H. influenzae* e *M. catarrhalis*).

colony morphology, haemolysis in horse-blood culture and identification of Lancefield group A via the agglutination latex test using a commercial kit (Slidex Strepto A, bioMérieux®). For *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*), colony morphology, susceptibility to optoquin and occasionally solubility in bile. For *Haemophilus influenzae*, colony morphology and the presence of factors X and V. For *Moraxella catarrhalis* colony morphology, oxidase production, DNase production and occasional use of the commercial API NH (bioMérieux®) system.

Determining antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility was determined using discs with suitable antimicrobial concentrations. These were diffused in agar, in accordance with the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recommendations⁶. The antimicrobials tested were penicillin (only *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*), ampicillin (*Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*), amoxicillin (*Streptococcus pneumoniae*), amoxicillin/clavulanate, cefuroxime, erythromycin, clarithromycin, azithromycin, tetracycline, clindamycin (*Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*), co-trimoxazole (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*), cloranphenicol (*Streptococcus pneumoniae*), levofloxacin (*Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*) and ciprofloxacin (*Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*).

Concentrações inibitórias mínimas (CIM)

A determinação das CIM efectuou-se recorrendo à utilização de E-testes (AB Biodisk®), de acordo com as recomendações do fabricante e como referido em trabalho anterior¹. Foram determinadas as CIM da penicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato e levofloxacina em todas as estirpes de *S. pneumoniae*. Em relação a todos os restantes microrganismos e antimicrobianos (com excepção do co-trimoxazol e cloranfenicol), determinaram-se as CIM sempre que se detectou resistência com a metodologia descrita. Para interpretar os resultados usaram-se os valores das concentrações críticas (*break-points*) indicados pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)⁶. Sempre que a leitura das CIM recaiu entre dois valores, foi considerado o mais elevado. As estirpes de controlo utilizadas foram: *H. influenzae* ATCC 49766, *H. influenzae* ATCC 49247, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 35218.

Determinação do fenótipo de resistência aos macrólidos

A determinação do fenótipo de resistência aos macrólidos foi efectuada recorrendo a um método em que se coloca um disco de eritromicina (15µg) a cerca de 20 mm de distância de um disco de clindamicina (2µg) à superfície de uma placa contendo meio de Mueller-Hinton com 5% de sangue previamente inoculada com a estirpe em estudo⁷. Após 18-24 horas de incubação a 35°C, observam-se as zonas de inibição à volta dos dois discos. O fenótipo M de resistência observa-se

Minimum Inhibitory Concentrations (MICs)

MICs were determined via the use of E-tests (AB Biodisk®) in accordance with the manufacturer's instructions, as stated in our earlier study¹. The MICs of penicillin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanate and levofloxacin in all *Streptococcus pneumoniae* strains were determined. The MICs of all the other microorganisms and antimicrobials (except co-trimoxazole and cloranphenicol) were determined whenever resistance was detected using the methodology described above. The ratios of the critical concentrations – the break-points – described by the NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)⁶ were used to interpret the results. Whenever the reading of the MICs fell between two ratios, the higher was the one taken into consideration. The control strains used were *Haemophilus influenzae* ATCC 49766, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 35218.

Determining the macrolide resistant phenotype

The macrolide resistant phenotype was determined using a method in which an erythromycin disc (15µg) was placed approximately 20 mm away from clindamycin disc (2µg) on top of a plaque containing Mueller-Hinton agar with 5% of blood previously inoculated with the strain under study⁷. After 18-24 hours of incubation at 35°C areas of inhibition could be seen around the two discs. The M resistant phenotype is seen when there

quando há inibição do crescimento apenas em volta do disco de eritromicina, sem interferência no halo de inibição do disco da clindamicina. No fenótipo MLS_B ou há diminuição acentuada ou ausência de halo de inibição em volta dos dois discos (resistência constitutiva), ou diminuição acentuada ou ausência de halo de inibição no disco de eritromicina e uma diminuição sectorial da zona de inibição em volta do disco de clindamicina proximal ao disco de eritromicina (resistência indutível).

Pesquisa de β -lactamase

Pesquisou-se a produção de β -lactamase em *H. influenzae* e *M. catarrhalis* utilizando como substrato a nitrocefina, com *Identification sticks β -lactamase* (Oxoid®).

Resultados

Nos anos 2003 e 2004 estudaram-se no total 2945 bactérias, com a seguinte distribuição: *S. pyogenes* (513), *S. pneumoniae* (1300), *H. influenzae* (829) e *M. catarrhalis* (303). Para além dos valores totais, os resultados apresentam-se discriminando as estirpes isoladas de adultos e de pediatria. Consideraram-se no último grupo os doentes com idades até 18 anos.

Streptococcus pyogenes

Das 513 estirpes de *S. pyogenes* (229 isoladas em 2003 e 284 em 2004), 449 (87,5%) foram isoladas de doentes de pediatria e 64 (12,5%) de adultos. No Quadro I apresentam-se as susceptibilidades aos antimicrobianos da totalidade das estirpes estudadas e, discriminadas e comparadas, as isoladas de adultos e de pediatria. Todos os microrganismos se revelaram suscep-

is growth inhibition only around erythromycin disc, without interference in the halo of inhibition in the clindamycin disc. In the phenotype MLS_B there is either marked diminution in or absence of the halo of inhibition around the two discs (constitutive resistance) or marked diminution in or absence of the halo of inhibition in the erythromycin disc and a partial diminution in the area of inhibition around the clindamycin disc near to the erythromycin disc (inducible resistance).

Beta-lactamase research

Research into beta-lactamase production in *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* was carried out using nitrocefina as a substrate with "Identification sticks β -lactamase" (Oxoid®).

Results

In 2003 and 2004 a total of 2945 bacteria were studied, distributed thus: *Streptococcus pyogenes* (513), *Streptococcus pneumoniae* (1300), *Haemophilus influenzae* (829) and *Moraxella catarrhalis* (303). In addition to the total ratios, the results are presented discriminating the strains isolated from adult and paediatric patients, with those aged less than 18 years being considered as the latter group.

Streptococcus pyogenes

Of the 513 strains of *Streptococcus pyogenes* (229 isolated in 2003 and 284 in 2004), 449 (87.5%) were taken from paediatric patients and 64 (12.5%) from adult patients. Table I shows the susceptibility of the entire range of strains which were studied to the antimicrobial agents. It also discriminates and compares the strains iso-

ESTUDO VIRIATO: ACTUALIZAÇÃO DE DADOS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS RESPONSÁVEIS POR INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE EM PORTUGAL EM 2003 E 2004

J. Melo-Cristino, Letícia Santos, Mário Ramirez e Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias

Quadro I – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 513 estirpes de *Streptococcus pyogenes* isoladas em 2003 e 2004.

| | <i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 513) | | |
|-------------------------|--|-------------------------------|----------------------|
| | Adultos n = 64 (12,5 %) | Pediatria n = 449 (87,5 %) | Total n = 513 |
| Antimicrobiano | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes |
| Penicilina | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Amoxicilina/clavulanato | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Eritromicina | 10 (15,6 %) | 87 (19,4 %) | 97 (18,9 %) |
| Claritromicina | 10 (15,6 %) | 87 (19,4 %) | 97 (18,9 %) |
| Azitromicina | 10 (15,6 %) | 87 (19,4 %) | 97 (18,9 %) |
| Clindamicina | 5 (7,8 %) | 26 (5,8 %) | 31 (6,0 %) |
| Tetraciclina | 5 (7,8 %) | 24 (5,3 %) | 29 (5,6 %) |
| Levofloxacina | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

Table I – Antimicrobial susceptibility in the 513 *Streptococcus pyogenes* strains isolated in 2003 and 2004

| | <i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 513) | | |
|-------------------------|--|---|-------------------|
| | Adult patients n = 64 (12.5 %) | Paediatric patients n = 449 (87.5 %) | Total n = 513 |
| Antimicrobial | Resistant strains | Resistant strains | Resistant strains |
| Penicillin | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Amoxicillin/clavulanate | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Erythromycin | 10 (15.6 %) | 87 (19.4 %) | 97 (18.9 %) |
| Clarithromycin | 10 (15.6 %) | 87 (19.4 %) | 97 (18.9 %) |
| Azithromycin | 10 (15.6 %) | 87 (19.4 %) | 97 (18.9 %) |
| Clindamycin | 5 (7.8 %) | 26 (5.8 %) | 31 (6.0 %) |
| Tetracycline | 5 (7.8 %) | 24 (5.3 %) | 29 (5.6 %) |
| Levofloxacin | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

Todos os microrganismos se revelaram susceptíveis aos antibióticos β -lactâmicos

tíveis aos antibióticos β -lactâmicos. A resistência aos macrólidos, cruzada entre os 3 ensaiados (eritromicina, claritromicina e azitromicina), foi de 20,5% em 2003 e de 17,6% em 2004 e à tetraciclina de 6,1%

lated from adult patients with those taken from paediatric patients. All the microorganisms show susceptibility to beta-lactamase antibiotics. Resistance to the macrolides, crossed between the 3 trials,

e 4,9%, respectivamente. Não foram isoladas estirpes resistentes à levofloxacina. Em relação ao fenótipo de resistência aos macrólidos, 76,6% das estirpes isoladas em 2003 e 58,0% das isoladas em 2004 revelaram o fenótipo M e 23,4% e 42% o fenótipo MLS_B , respectivamente. Juntando os dois anos, verificou-se que os valores de CIM_{90} para a eritromicina foram de 16 mg/L e para a clindamicina de 0,094 mg/L.

Streptococcus pneumoniae

Foram estudadas 1300 estirpes de *S. pneumoniae* (565 em 2003 e 735 em 2004), das quais 1024 (78,8%) isoladas de adultos e 276 (21,2%) de doentes pediátricos. No Quadro II apresenta-se a susceptibilidade aos antimicrobianos da sua totalidade e, discriminadas e comparadas, as estirpes de adultos e de pediatria. Nesta espécie definem-se dois patamares de resistência à penicilina, a resistência intermédia, caracterizada por valores de $CIM \geq 0,1$ mg/L e < 2 mg/L, e a resistência elevada, definida por valores de $CIM \geq 2$ mg/L. Demonstrou-se haver susceptibilidade diminuída à penicilina em 109 (19,3%) casos em 2003 e em 130 (17,7%) em 2004, dos quais 86 (15,2%) e 23 (4,1%) revelaram resistência intermédia e 108 (14,7%) e 22 (3,0%) resistência elevada, respectivamente. Os valores de CIM_{50} e de CIM_{90} para a amoxicilina e amoxicilina/clavulanato foram respectivamente de 0,016 mg/L e 0,5 mg/L. A resistência aos macrólidos atingiu o valor de 18,8%. Em relação ao fenótipo de resistência, 83,7% das estirpes revelaram o fenótipo MLS_B e 16,3% o fenótipo M. Os valores de CIM_{50} e de CIM_{90} para a eritromicina e para a

(erythromycin, clarithromycin and azithromycin) was 20.5% in 2003 and 17.6% in 2004. The tetracycline situation was 6.1% in 2003 and 4.9% in 2004. There were no levofloxacin-resistant strains isolated. In relation to the macrolides-resistant phenotype, 76.6% of the strains isolated in 2003 and 58.0% isolated in 2004 showed the M phenotype, and 23.4% and 42% the MLS_B phenotype.

MIC_{90} ratios for erythromycin were 16 mg/L and 0.094 mg/L for clindamycin over the two years.

Streptococcus pneumoniae

1300 strains of *Streptococcus pneumoniae* (565 in 2003 and 735 in 2004) were studied. Of these 1024 (78.8%) were isolated from adult patients and 276 (21.2%) from paediatric patients. Table II shows the total antimicrobial susceptibility and discriminates and compares the strains isolated from adult patients with those taken from paediatric patients. Two levels of penicillin resistance were defined for this species; intermediate resistance, characterised by ratios of $MIC \geq 0.1$ mg/L and < 2 mg/L, and high resistance, defined by ratios of $MIC \geq 2$ mg/L. Diminished susceptibility to penicillin was seen in 109 (19.3%) cases in 2003 and in 130 (17.7%) in 2004, of which 86 (15.2%) and 23 (4.1%) showed intermediate resistance and 108 (14.7%) and 22 (3.0%) respectively showed high resistance. The MIC_{50} and $MMIC_{90}$ ratios for amoxicillin were 0.016 mg/L and 0.5 mg/L for amoxicillin/clavulanate. Macrolide resistance was 18.8%. In relation to the resistance-phenotype, 83.7% of the strains showed the MLS_B phenotype and 16.3% the M phenotype. The MIC_{50} and

ESTUDO VIRIATO: ACTUALIZAÇÃO DE DADOS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS RESPONSÁVEIS POR INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE EM PORTUGAL EM 2003 E 2004

J. Melo-Cristino, Letícia Santos, Mário Ramirez e Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias

Quadro II – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 1300 estirpes de *Streptococcus pneumoniae* isoladas em 2003 e 2004

| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> (n = 1300) | | |
|-------------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| | Adultos n = 1024 (78,8 %) | Pediatria n = 276 (21,2 %) | Total n = 1300 |
| Antimicrobiano | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes |
| Penicilina I | 150 (14,6 %) | 44 (15,9 %) | 194 (14,9 %) |
| Penicilina R | 27 (2,6 %) | 18 (6,5 %) | 45 (3,5 %) |
| Amoxicilina | 3 (0,3 %) | 4 (1,4 %) | 7 (0,5 %) |
| Amoxicilina/clavulanato | 3 (0,3 %) | 4 (1,4 %) | 7 (0,5 %) |
| Cefuroxima | 66 (6,4%) | 26 (9,4%) | 92 (7,1%) |
| Eritromicina | 184 (18,0 %) | 61 (22,1 %) | 245 (18,8 %) |
| Clarithromicina | 184 (18,0 %) | 61 (22,1 %) | 245 (18,8 %) |
| Azitromicina | 184 (18,0 %) | 61 (22,1 %) | 245 (18,8 %) |
| Clindamicina | 159 (15,5 %) | 48 (17,4 %) | 207 (15,9 %) |
| Tetraciclina | 143 (14,0 %) | 45 (16,3 %) | 188 (14,5 %) |
| Levofloxacina | 5 (0,5 %) | 0 (0 %) | 5 (0,4 %) |
| Co-trimoxazol | 164 (16,0 %) | 50 (18,1 %) | 214 (16,5 %) |
| Cloranfenicol | 37 (3,6 %) | 10 (3,6 %) | 47 (3,6 %) |

Penicilina I - Resistência intermédia à penicilina; Penicilina R - Resistência elevada à penicilina.

Table II – Antimicrobial susceptibility in the 1300 *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in 2003 and 2004

| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> (n = 1300) | | |
|-------------------------|---|---|-------------------|
| | Adult patients n = 1024 (78,8 %) | Paediatric patients n = 276 (21,2 %) | Total n = 1300 |
| Antimicrobial | Resistant strains | Resistant strains | Resistant strains |
| Penicillin I | 150 (14.6 %) | 44 (15.9 %) | 194 (14.9 %) |
| Penicillin H | 27 (2.6 %) | 18 (6.5 %) | 45 (3.5 %) |
| Amoxicillin | 3 (0.3 %) | 4 (1.4 %) | 7 (0.5 %) |
| Amoxicillin/clavulanate | 3 (0.3 %) | 4 (1.4 %) | 7 (0.5 %) |
| Cefuroxime | 66 (6.4%) | 26 (9.4%) | 92 (7.1%) |
| Erythromycin | 184 (18.0 %) | 61 (22.1 %) | 245 (18.8 %) |
| Clarithromycin | 184 (18.0 %) | 61 (22.1 %) | 245 (18.8 %) |
| Azithromycin | 184 (18.0 %) | 61 (22.1 %) | 245 (18.8 %) |
| Clindamycin | 159 (15.5 %) | 48 (17.4 %) | 207 (15.9 %) |
| Tetracycline | 143 (14.0 %) | 45 (16.3 %) | 188 (14.5 %) |
| Levofloxacin | 5 (0.5 %) | 0 (0 %) | 5 (0.4 %) |
| Co-trimoxazole | 164 (16.0 %) | 50 (18.1 %) | 214 (16.5 %) |
| Cloranphenicol | 37 (3.6 %) | 10 (3.6 %) | 47 (3.6 %) |

Penicillin I - Intermediate resistance to penicillin; Penicillin H - High resistance to penicillin.

clindamicina foram superiores a 256 mg/L nas estirpes resistentes. Para a levofloxacina encontraram-se valores de CIM₅₀ de 0,5 mg/L e de CIM₉₀ de 0,5 mg/L. Apenas 5 estirpes (0,4%) eram resistentes a esta quinolona, revelando todas CIM superiores a 32 mg/L. Os valores de CIM₉₀ para a tetraciclina foram de 16 mg/L.

Haemophilus influenzae

Da espécie *H. influenzae* estudaram-se 829 microrganismos, 448 de 2003 e 381 de 2004. Destes, 625 (75,4%) foram isolados de adultos e 204 (24,6%) de pediatria. No Quadro III apresenta-se a susceptibilidade aos antimicrobianos da totalidade das estirpes e, discriminadas e comparadas, as de adultos e de pediatria. A produção de β-lactamase, mais frequente em crianças do que em adultos, verificou-se em 46 (10,3%) estirpes em 2003 e em 37 (9,7%) em 2004. De acordo com o esperado, todas estas estirpes eram resistentes à ampicilina mas susceptíveis à amoxicilina/clavulanato. Em apenas sete estirpes resistentes à ampicilina não foi detectada a produção de beta-lactamases, sendo estas também resistentes à amoxicilina/clavulanato e à cefuroxima, 4 isoladas em adultos e 3 em crianças. Com excepção da resistência ao co-trimoxazol (13,4%), tanto a resistência à claritromicina como à tetraciclina foram baixas, respectivamente 5,5% e 1,4%. Todos os microrganismos eram susceptíveis à azitromicina e à ciprofloxacina.

Moraxella catarrhalis

A susceptibilidade aos antimicrobianos das 303 estirpes de *M. catarrhalis* (137 de 2003 e 166 de 2004), das quais 186 (61,4%) isoladas de adultos e 117 (38,6%) de

MIC₉₀ ratios for the erythromycin and for the clindamycin were over 256 mg/L in the resistant strains. MIC₅₀ ratios of 0.5 mg/L and MIC₉₀ ratios of 0.5 mg/L were seen for the levofloxacin. Only 5 strains (0.4%) were quinolone resistant, all showing MICs above 32 mg/L. The MIC₉₀ ratios for the tetracycline were 16 mg/L.

Haemophilus influenzae

829 *Haemophilus influenzae* species microorganisms were studied, 448 from 2003 and 381 from 2004. Of these, 625 (75.4%) were isolated from adult patients and 204 (24.6%) from paediatric patients. Table III shows the susceptibility to the antimicrobial agents of the entire range of strains which were studied. It also discriminates and compares the strains isolated from adult patients with those taken from paediatric patients. Beta-lactam production, more frequent in children than adults, was seen in 46 (10.3%) strains in 2003 and in 37 (9.7%) in 2004. Just as predicted, all the strains were ampicillin resistant, but amoxicillin/clavulanate sensitive. There were only seven ampicillin resistant strains in which no beta-lactam production was seen, and these were also amoxicillin/clavulanate and cefuroxime resistant. 4 were isolated from adult patients and 3 from paediatric patients. Co-trimoxazole resistance (13.4%) notwithstanding, clarithromycin and tetracycline resistance were low, 5.5% and 1.4% respectively. All the microorganisms were azithromycin and ciprofloxacin susceptible.

Moraxella catarrhalis

Table IV shows the susceptibility of the antimicrobials to the 303 strains of

ESTUDO VIRIATO: ACTUALIZAÇÃO DE DADOS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS RESPONSÁVEIS POR INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE EM PORTUGAL EM 2003 E 2004

J. Melo-Cristino, Letícia Santos, Mário Ramirez e Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias

Quadro III – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 829 estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas em 2003 e 2004

| | <i>Haemophilus influenzae</i> (n = 829) | | |
|-------------------------|--|------------------------------|----------------------|
| | Adultos n = 625 (75,4%) | Pediatria n = 204 (24,6%) | Total n = 829 |
| Antimicrobiano | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes |
| Ampicilina | 57 (9,1 %) | 33 (16,2 %) | 90 (10,9 %) |
| Amoxicilina/clavulanato | 4 (0,6 %) | 3 (1,5 %) | 7 (0,8 %) |
| Cefuroxima | 4 (0,6 %) | 3 (1,5 %) | 7 (0,8 %) |
| Clarithromicina | 32 (5,1 %) | 14 (6,9 %) | 46 (5,5 %) |
| Azitromicina | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) |
| Ciprofloxacina | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) |
| Tetraciclina | 7 (1,1 %) | 5 (2,5 %) | 12 (1,4 %) |
| Co-trimoxazol | 75 (12,0 %) | 36 (17,6 %) | 111 (13,4 %) |

Table III – Antimicrobial susceptibility in the 829 *Haemophilus influenzae* strains isolated in 2003 and 2004

| | <i>Haemophilus influenzae</i> (n = 829) | | |
|-------------------------|--|--|-------------------|
| | Adult patients n = 625 (75.4%) | Paediatric patients n = 204 (24.6%) | Total n = 829 |
| Antimicrobial | Resistant strains | Resistant strains | Resistant strains |
| Ampycilin | 57 (9.1 %) | 33 (16.2 %) | 90 (10.9 %) |
| Amoxicillin/clavulanate | 4 (0.6 %) | 3 (1.5 %) | 7 (0.8 %) |
| Cefuroxime | 4 (0.6 %) | 3 (1.5 %) | 7 (0.8 %) |
| Clarithromycin | 32 (5.1 %) | 14 (6.9 %) | 46 (5.5 %) |
| Azithromycin | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) |
| Ciprofloxacin | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) |
| Tetracycline | 7 (1.1 %) | 5 (2.5 %) | 12 (1.4 %) |
| Co-trimoxazole | 75 (12.0 %) | 36 (17.6 %) | 111 (13.4 %) |

doentes pediátricos, está apresentada no Quadro IV. Como o NCCLS não indica valores de concentrações críticas para interpretar a susceptibilidade desta espécie, adoptaram-se os valores indicados para *Haemophilus* spp., a exemplo do que é

Moraxella catarrhalis (137 from 2003 and 166 from 2004). 186 (61.4%) were isolated from adult patients and 117 (38.6%) from paediatric patients. As the NCCLS does not give critical concentration ratios with which to interpret the susceptibility of

ESTUDO VIRIATO: ACTUALIZAÇÃO DE DADOS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS RESPONSÁVEIS POR INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE EM PORTUGAL EM 2003 E 2004

J. Melo-Cristino, Leticia Santos, Mário Ramirez e Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias

Quadro IV – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 303 estirpes de *Moraxella catarrhalis* isoladas em 2003 e 2004

| | <i>Moraxella catarrhalis</i> (n = 303) | | |
|-------------------------|---|------------------------------|----------------------|
| | Adultos n = 186 (61,4%) | Pediatria n = 117 (38,6%) | Total n = 303 |
| Antimicrobiano | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes | Estirpes resistentes |
| Ampicilina | 179 (96,2 %) | 113 (96,6 %) | 292 (96,4 %) |
| Amoxicilina/clavulanato | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) |
| Cefuroxima | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) |
| Claritromicina | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) |
| Azitromicina | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) |
| Ciprofloxacina | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) |
| Tetraciclina | 2 (1,0 %) | 1 (0,9 %) | 3 (1,0 %) |
| Co-trimoxazol | 50 (26,9 %) | 32 (27,4 %) | 82 (27,1 %) |

Table IV – Antimicrobial susceptibility in the 303 *Moraxella catarrhalis* strains isolated in 2003 and 2004

| | <i>Moraxella catarrhalis</i> (n = 303) | | |
|-------------------------|---|--|-------------------|
| | Adult patients n = 186 (61.4%) | Paediatric patients n = 117 (38.6%) | Total n = 303 |
| Antimicrobial | Resistant strains | Resistant strains | Resistant strains |
| Ampycilin | 179 (96.2 %) | 113 (96.6 %) | 292 (96.4 %) |
| Amoxicillin/clavulanate | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) |
| Cefuroxime | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) |
| Clarithromycin | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) |
| Azithromycin | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) |
| Ciprofloxacin | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) | 0 (0.0 %) |
| Tetracycline | 2 (1.0 %) | 1 (0.9 %) | 3 (1.0 %) |
| Co-trimoxazole | 50 (26.9 %) | 32 (27.4 %) | 82 (27.1 %) |

frequentemente referido na literatura¹. O principal mecanismo de resistência foi a produção de beta-lactamase, que se observou em 292 microrganismos (96,4%) estudados e que correspondeu à resistência à ampicilina. Para além da ampicilina,

this species, the ratios given for *Haemophilus* spp., are used. This example is frequently referred to in studies¹. The main resistance mechanism was the production of beta-lactams, which was seen in 292 microrganisms (96.4%) studied and which corre-

detectou-se apenas resistência ao co-trimoxazol (27,1%) e à tetraciclina (1,0%). Todas as estirpes se revelaram susceptíveis à amoxicilina/clavulanato, cefuroxima, claritromicina, azitromicina e ciprofloxacina.

Discussão

O conhecimento contínuo e actualizado da susceptibilidade aos antimicrobianos das principais bactérias responsáveis por infecção do aparelho respiratório adquirida na comunidade no nosso país é importante, não só porque tem sido referido um aumento nas resistências mas também porque, por vezes, há variação significativa na sua prevalência. O Estudo Viriato tem permitido um acompanhamento da situação nacional desde 1999. Os dados apresentados no presente texto têm por base uma população constituída por 2996 bactérias e actualizam os anteriormente divulgados^{1,2,3}, correspondentes aos anos de 1999 a 2002.

As 513 estirpes de *S. pyogenes* (*Streptococcus* beta-hemolíticos do Grupo A de Lancefield) isoladas de doentes com amigdalite/faringite eram na sua totalidade susceptíveis à penicilina e aos restantes compostos beta-lactâmicos, como seria de esperar, dado que não foram ainda descritas resistências a esta classe de antibióticos. A penicilina continua a ser o fármaco de eleição para a terapêutica da amigdalite estreptocócica devido à sua eficácia provada, segurança, espectro estreito e baixo custo⁸.

Os macrólidos são frequentemente sugeridos como alternativa. Portugal tem sido um dos países europeus onde se tem encontrado resistência elevada aos ma-

spend to the ampicillin resistance. In addition to ampicillin, only resistance to co-trimoxazole (27.1%) and tetracycline (1.0%) was seen. All the strains were susceptible to amoxicillin/clavulanate, cefuroxime, clarithromycin, azithromycin and ciprofloxacin.

Discussion

On-going up-dating of the susceptibility of the antimicrobials of the main bacteria responsible for community acquired respiratory tract infection in Portugal is important for two reasons. Firstly because an increase in resistance has been seen and secondly because there is sometimes a significant variation in its prevalence. The Viriato study has enabled the situation in Portugal to be monitored since 1999. The data presented here is based on a population made up of 2996 bacteria and up-dates that were previously published^{1,2,3}, and which corresponded to the years 1999-2002.

The 513 *Streptococcus pyogenes* strains (*Streptococcus* beta-hemolyticus of the Lancefield A Group) isolated from tonsillitis/pharyngitis patients were all penicillin susceptible and the remaining beta-lactamase complexes susceptible. This was as expected, given that resistance to this class of antibiotics has not yet been described. Penicillin continues to be the gold standard of therapeutic options for streptococcus tonsillitis owing to its proven efficacy, safety, narrow spectrum and low costs⁸. Macrolides are frequently suggested as an alternative. Portugal has proved to be one of the European countries where greater resistance to macrolides (erythromycin, clarithromycin and azithromycin) of this

O Estudo Viriato tem permitido um acompanhamento da situação nacional desde 1999

crólidos (eritromicina, claritromicina e azitromicina) nesta espécie. Os valores mais altos de resistência, 35,8%, foram encontrados nos anos de 1998 e 1999⁷. Nos anos seguintes, a resistência desceu para valores próximos dos 25%², situação que se manteve até 2004. Contudo, apesar da estabilidade na percentagem de resistência, ocorreu uma inversão no fenótipo dominante, que inicialmente era o MLS_B (85% das estirpes resistentes), posteriormente substituído, nos últimos anos, pelo fenótipo M. Esta alteração não pode ser atribuída unicamente ao aumento no consumo de macrólidos porque o fenótipo MLS_B confere resistência de nível elevado a todos os macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B, ao passo que o fenótipo M apenas confere resistência de nível baixo aos macrólidos eritromicina, claritromicina e azitromicina. A caracterização genotípica destas estirpes⁹ mostrou que a alteração no fenótipo resultou de uma diminuição na frequência de isolamento do clone dominante com fenótipo MLS_B e da sua substituição por diversos clones com fenótipo M. Curiosamente, estes não são os mais prevalentes em Espanha, apesar de no país vizinho 95% das estirpes resistentes aos macrólidos apresentarem o fenótipo M¹⁰. Estes resultados continuam a desaconselhar o uso de macrólidos na terapêutica empírica da amigdalofaringite aguda no país porque a probabilidade de insucesso terapêutico é elevada.

Apesar de se ter continuado a verificar uma diminuição na resistência à tetraciclina (actualmente de 5,6%) associada à diminuição da importância do clone dominante do fenótipo MLS_B anteriormente referido e ausência de resistência à levo-

species has been found. The highest resistance ratios – 35.8% – were found in 1998 and 1999⁷. Resistance fell to ratios of around 25%² in the following years and this continued until 2004. Despite the stability in the percentage of resistance, there was, however, an inversion in the dominant phenotype. Initially this was the MLS_B phenotype (85% of the resistant strains), but this has been replaced over the last few years by the M phenotype. This change cannot be solely attributed to the increase in macrolide consumption as the MLS_B phenotype confers high level resistance to all macrolides, lincosamides and streptogramin B, while the M phenotype only confers low level resistance to the erythromycin, clarithromycin and azithromycin macrolides. The genotype characterization of these strains⁹ shows that the alteration in the phenotype stemmed from a decrease in the frequency of isolation of the dominant clone with the MLS_B phenotype and its replacement with several M phenotype clones. Curiously, these are not the most prevalent strains in Spain, even though in Portugal's neighbouring country 95% of the macrolide-resistant strains show the M phenotype¹⁰. These results continue to show that it is not advisable to use macrolides as practical treatment measures for acute tonsillitis/pharyngitis in Portugal as there is a high probability of this treatment being unsuccessful.

There is a continuing decrease in tetracycline resistance (currently 5.6%) associated with the decrease in the importance of the dominant MLS_B phenotype clone, as abovementioned, and the lack of levofloxacin resistance. Despite this, how-

floxacina, estes antibióticos não têm interesse na terapêutica da amigdalite estreptocócica, sobretudo na população pediátrica, que constituiu a maioria da amostra estudada.

Nos dois anos a que se refere o presente texto estudaram-se 1300 estirpes de *S. pneumoniae*. Depois de se ter verificado um aumento significativo na resistência à penicilina há cerca de uma década¹¹, a situação estabilizou durante alguns anos em valores compreendidos entre os 20% e os 25%^{1,2,3}, tendo, nos últimos anos, vindo a verificar-se uma diminuição nos valores de resistência (19,2% em 2003 e 17,7% em 2004), sobretudo na resistência elevada, que, nos últimos dois anos, foi de apenas 4,1% e 3,0%, respectivamente. Também as diferenças, por vezes acentuadas, entre os valores encontrados em adultos e em doentes pediátricos não se verificaram nos últimos anos.

A recente diminuição observada na resistência à penicilina poderá ser consequência da utilização da recente vacina conjugada 7-valente que inclui os serótipos mais frequentemente resistentes à penicilina^{12,13}.

Em relação aos outros antibióticos beta-lactâmicos ensaiados, encontraram-se percentagens de resistência de 0,5% à amoxicilina e à amoxicilina/clavulanato e de 7,1% à cefuroxima. A aparente contradição entre valores de resistência à penicilina e aos outros antibióticos beta-lactâmicos nesta espécie deve-se ao facto de serem definidos valores de concentrações críticas diferentes para a interpretação da categoria de susceptibilidade para cada um destes antimicrobianos⁶. Recordar-se que, para a terapêutica das infecções por

ever, these antibiotics are not used in the treatment of streptococcus tonsillitis, particularly in the paediatric population, the population which makes up the greater part of the sample studied.

In the two years this study covers, 1300 strains of *Streptococcus pneumoniae* were studied. After a significant increase in penicillin-resistance was seen for around a decade¹¹, the situation stabilised for some years with ratios of between 20% and 25%^{1,2,3}. The last few years has brought a decrease in resistance levels (19.2% in 2003 and 17.7% in 2004), especially in high-level resistance which has been only 4.1% and 3.0% respectively. The differences - which were sometimes marked - between the ratios seen in adult and paediatric patients, have not been seen over the last few years. The recent decrease seen in resistance to penicillin may be a consequence of the use of the recent 7-valente conjugate vaccine which includes the most frequent penicillin-resistant serotypes^{12,13}.

In relation to the other beta-lactamase antibiotics studied, a 0.5% resistance to amoxicillin and amoxicillin/clavulanate was seen, along with a 7.1% resistance to cefuroxime. The seeming contradiction between the ratios of resistance to penicillin and the other beta-lactamase antibiotics of this species is due to different critical concentration ratios being defined for interpreting the category of susceptibility for each of these antimicrobials⁶. It will be remembered that for treating pneumococcus infections, adding clavulanate to amoxicillin brings no benefits, as the mechanism of resistance is not via the production of beta-lactams.

Although beta-lactams, in particular peni-

Para a terapêutica das infecções por pneumococos, não há benefício na adição do ácido clavulânico à amoxicilina

pneumococos, não há benefício na adição do ácido clavulânico à amoxicilina, porque o mecanismo de resistência não é por produção de beta-lactamase.

Embora a utilização de antibióticos beta-lactâmicos, nomeadamente de penicilina, continuar a ser considerada a terapêutica de eleição nas infecções respiratórias de etiologia pneumocócica, incluindo as causadas por estirpes com resistência intermédia¹⁴, a prevalência elevada destes microrganismos é uma realidade preocupante porque frequentemente as estirpes são também resistentes a outros antibióticos, como se verificou no presente estudo.

Em pneumococos, na última década, a subida mais acentuada continuou a observar-se na resistência aos macrólidos (eritromicina, claritromicina e azitromicina)¹⁵, tendo atingido valores de 20,2% em 2003 e 17,8% em 2004. Neste microrganismo, o fenótipo largamente dominante foi o MLS_B (83,7%), o que condicionou a detecção dos valores elevados de CIM₉₀ (> 256mg/L) para todos os macrólidos e para a clindamicina, não tendo havido variações nos últimos anos, ao contrário do que se observou em *S. pyogenes*.

A resistência à levofloxacina detectou-se apenas em 0,4% das estirpes estudadas nos dois últimos anos. A comparação com a realidade de anos anteriores fica prejudicada porque se ensaiaram quinolonas diferentes nesses anos (ciprofloxacina e ofloxacina), mas pode afirmar-se que é ainda rara a resistência às quinolonas com boa actividade anti-pneumocócica. A resistência aos antibióticos em *H. influenzae* (foram estudadas nestes dois anos 829 estirpes) não tem aumentado em Portu-

cillin, are still considered the gold standard in the treatment of respiratory infections of a pneumococcus aetiology – including those caused by intermediate resistance strains¹⁴ – the high number of these microorganisms is a worrying reality as the strains are frequently resistant to other antibiotics too, as this study shows. The most strongly marked increase in pneumococcus over the last decade has continued to be seen in macrolides (erythromycin, clarithromycin and azithromycin)¹⁵ resistance. This reached ratios of 20.2% in 2003 and 17.8% in 2004. The more dominant phenotype in this microorganism was the MLS_B (83.7%). This facilitated the detection of the higher MIC₉₀ ratios (> 256mg/L) for all the macrolides and while there has been no variation seen in clindamycin over the last few years, the same cannot be said for *Streptococcus pyogenes*.

Resistance to levofloxacin has been found in only 0.4% of the strains under study in the last two years. Comparisons with the earlier situation were flawed because different quinolones (ciprofloxacin and ofloxacin) were used in these years but it can be affirmed that quinolone-resistance is still rare with good antipneumococcal activity. Antibiotic-resistance in *Haemophilus influenzae* (829 strains were studied over these two years) has not grown over the last decade in Portugal. The current amount (10%) of beta-lactam producing strains, which condition ampicillin resistance, is similar to that found in 1992 (11.2%)¹⁶. Only seven strains (0.8%) which are ampicillin, amoxicillin/clavulanate and cefuroxime resistant and not beta-lactamase producers have been seen. This

gal na última década. O valor actual de estirpes produtoras de beta-lactamase (10%), que condiciona a resistência à ampicilina, é semelhante ao encontrado em 1992 (11,2%)¹⁶. Detectaram-se apenas sete estirpes (0,8%) resistentes à ampicilina, amoxicilina / clavulanato e cefuroxima e não produtoras de beta-lactamase. Este mecanismo de resistência continua a ser muito raro no país. Finalmente, a resistência ao co-trimoxazol foi de 13,4%, à tetraciclina de 1,4 %, e todas as estirpes se revelaram susceptíveis à azitromicina e à ciprofloxacina. Nos macrólidos, encontrou-se uma resistência de 5,5% à claritromicina e ausência de resistência à azitromicina.

Das 303 estirpes de *M. catarrhalis*, 96,4% produzem beta-lactamase. Este valor foi semelhante ao encontrado desde o início do Estudo Viriato. A produção de beta-lactamase foi o principal mecanismo de resistência encontrado, o que tem sido descrito em estudos recentes de âmbito idêntico¹⁷. Para além da resistência à ampicilina, demonstrou-se resistência ao co-trimoxazol em 27,1% das estirpes e, pela primeira vez, encontraram-se 3 estirpes (1,0%) resistentes à tetraciclina. Com base nestes dados pode continuar a afirmar-se que, presentemente, as estirpes de *M. catarrhalis* são resistentes à ampicilina e amoxicilina devido à produção de beta-lactamase e susceptíveis à maioria dos restantes antimicrobianos potencialmente úteis na terapêutica das infecções respiratórias, incluindo beta-lactâmicos (resistentes às beta-lactamases ou associados a inibidores destas enzimas), macrólidos, tetraciclina (doxiciclina) e quinolonas. Tendo em consideração os valores de

resistência mecanismo is still very rare in Portugal. Finally, co-trimoxazole resistance was 13.4%, tetracycline 1.4 % and all strains were azithromycin and ciprofloxacin susceptible. The macrolides showed a 5.5% resistance to clarithromycin and lack of azithromycin resistance. Of the 303 strains of *Moraxella catarrhalis*, 96.4% produce beta-lactams. This ratio was similar to that which has been found since the beginning of the Viriato study. Beta-lactamase production was the main resistance mechanism found and has been described in recent studies with an identical scope¹⁷. In addition to ampicillin resistance, co-trimoxazole resistance was seen in 27.1% of the strains and, for the first time, 3 (1.0%) tetracycline-resistant strains were found. Based on these data we can continue to affirm that at present *Moraxella catarrhalis* strains are ampicillin and amoxicillin resistant due to beta-lactamase production and are also susceptible to the majority of the remaining antimicrobials potentially useful in treating respiratory infections, These include beta-lactamase macrolides (beta-lactamase resistant or associated with the inhibitors of these enzymes), tetracyclines (doxycycline) and quinolones.

Taking the ratio of susceptibility to all the antibiotics included in this study into account, penicillin continues to be the most active pharmaceutical product against *Streptococcus pyogenes*, amoxicillin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and the amoxicillin/clavulanate association, cefuroxime, azithromycin and ciprofloxacin against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. The pharmaceutical products which are most active simulta-

A penicilina continua a ser o fármaco mais activo contra *S. pyogenes*, a amoxicilina e a levofloxacina contra *S. pneumoniae* e a associação amoxicilina / clavulanato, a cefuroxima, a azitromicina e a ciprofloxacina contra *H. influenzae* e *M. catarrhalis*

susceptibilidade a todos os antibióticos incluídos no presente estudo, a penicilina continua a ser o fármaco mais activo contra *S. pyogenes*, a amoxicilina e a levofloxacina contra *S. pneumoniae* e a associação amoxicilina / clavulanato, a cefuroxima, a azitromicina e a ciprofloxacina contra *H. influenzae* e *M. catarrhalis*. Os fármacos mais activos simultaneamente contra *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis* isolados de doentes com infecções do aparelho respiratório inferior adquiridas na comunidade em Portugal são, na actualidade, a associação amoxicilina / clavulanato e as quinolonas. O presente trabalho procura ser um contributo, baseado em dados microbiológicos de milhares de estirpes, para a escolha dos antibióticos mais adequados à terapêutica empírica das infecções respiratórias bacterianas adquiridas na comunidade.

Como se têm verificado variações rápidas nas resistências, é essencial a continuação de estudos prospectivos de vigilância epidemiológica que permitam acompanhar a situação e comparar com rigor microrganismos isolados em múltiplos centros dispersos pelo país. O Estudo Viriato, pioneiro em Portugal para os quatro agentes estudados, preenche todos estes requisitos.

Agradecimento

A concretização do presente estudo foi possível graças à atribuição de uma bolsa pela GlaxoSmithKline, Portugal. Agradece-se o apoio técnico de Catarina Silva-Costa e Catarina Pronto.

neously against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community acquired lower respiratory tract infections in Portugal are currently the amoxicillin / clavulanate association and the quinolones. This study seeks to be a contribution, based on microbiological data from millions of strains, to the choice of the best antibiotics for the practical treatment of community acquired bacterial respiratory infections.

As rapid variations in resistance have been seen, what is essential is to continue prospective epidemiological monitoring studies that allow the situation to be followed and rigorously compare the microorganisms isolated in multiple centres spread throughout the country. The Viriato study, a groundbreaking study in Portugal for the four agents studied, meets these requirements.

Acknowledgements

This study was made possible by a grant awarded by GlaxoSmithKline, Portugal and is grateful for the technical assistance provided by Catarina Silva-Costa and Catarina Pronto.

Bibliografia/Bibliography

1. Melo-Cristino J, Fernandes ML, Serrano N and The Portuguese Surveillance Group For The Study Of Respiratory Pathogens. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microbial Drug Resistance* 2001; 7: 33-37.
2. Melo-Cristino J, Fernandes ML, Serrano N, e o Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* de infecções respiratórias adquiridas na comunidade em 2000. *Acta Médica Portuguesa* 2001; 14: 459-468.
3. Melo-Cristino J, Serrano N, e o Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. Estudo Viriato: Actualização de dados de susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias responsáveis por infecções respiratórias adquiridas na comunidade em Portugal em 2001 e 2002. *Rev Port Pneumol* 2003; 9: 293-310.
4. Bartlett RC, Mazens-Sullivan M, Tetreault JZ, Lobel S, Nivard J. Evolving approaches to management of quality in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 1994; 7: 55-88.
5. Barenfanger J. Improving the clinical utility of microbiology data: An update. *Clinical Microbiology Newsletter* 2003; 25: 1-8.
6. National Committee For Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Fourteenth Informational Supplement 24 (1) (M100-S14). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
7. Melo-Cristino J, Fernandes ML and The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. *Streptococcus pyogenes* isolated in Portugal: Macrolide resistance phenotypes and correlation with T types. *Microbial Drug Resistance* 1999; 5: 219-225.
8. Bisno AL, Gerber Ma, Gwaltney Jr Jm, Kaplan El, Schwartz Rh. Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: A practice guideline. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 25: 574-583.
9. Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J, and The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and *emm* types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2109-2111.
10. Albertí S, Garcia-Rey C, Dominguez Ma, Aguilar L, Cercenado E, Gobernado M, Garcia-Perea A, and The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Survey of *emm* gene sequences from pharyngeal *Streptococcus pyogenes* isolates collected in Spain and their relationship with erythromycin susceptibility. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2385-2390.
11. Vaz Pato MV, Carvalho CB, Tomasz A, and The Multicenter Study Group. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Portugal. A multicenter study between 1989 and 1993. *Microbial Drug Resistance* 1995; 1: 59-69.
12. Serrano I, Ramirez M, The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens And Melo-Cristino J. Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 652-656.
13. Serrano I, Melo-Cristino J, Carriço J, Ramirez M. Characterization of the genetic lineages responsible for pneumococcal invasive disease in Portugal. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1706-1715.
14. Heffelfinger JD, Dowell SW, Jorgensen JH, Klugman KP, Mabry LR, Musher DM, Plouffe JF, Rakowsky A, Schuchat A, Whitney CG, and the Drug-Resistant *Streptococcus Pneumoniae* Therapeutic Working Group. Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance. A report from the drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* working group. *Archives of Internal Medicine* 2000; 160: 1399-1408.
15. Melo-Cristino J, Ramirez M, Serrano N, Häscheid T, and The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. 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* 2003; 9: 73-80.
16. Bajanca-Lavado MP, Casin I, Vaz Pato MV and The Multicentre Study Group. Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal. *Journal of Anti-*

ESTUDO VIRIATO: ACTUALIZAÇÃO DE DADOS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
DE BACTÉRIAS RESPONSÁVEIS POR INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE
EM PORTUGAL EM 2003 E 2004

J. Melo-Cristino, Leticia Santos, Mário Ramirez e Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias

microbial Chemotherapy 1996; 38: 615-625.

17. Verduin Cm, Hol C, Fleer A, Van Dijk H, Van

Belkum A. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to es-

tablished pathogen. Clinical Microbiology Reviews

2002; 15: 125-144.