

SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS de *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* de infecções respiratórias adquiridas na comunidade em 2000*

J. MELO-CRISTINO, M^a LUÍS FERNANDES, NUNO SERRANO
E O GRUPO DE ESTUDO PORTUGUÊS DE BACTÉRIAS PATOGENICAS RESPIRATÓRIAS**
Laboratório de Microbiologia. Faculdade de Medicina de Lisboa. Instituto Bacteriológico Câmara Pestana. Lisboa

RESUMO

O Estudo Viriato é um estudo nacional, multicêntrico e prospectivo, da susceptibilidade aos antimicrobianos das principais bactérias responsáveis por infecção do tracto respiratório adquirida na comunidade. No ano de 2000 participaram 28 laboratórios de todo o País. Isolaram-se 1071 microrganismos que foram estudados num laboratório coordenador. Das 213 estirpes de *Streptococcus pyogenes* de doentes com amigdalofaringite aguda, todas eram susceptíveis à penicilina, amoxicilina/clavulanato e cefuroxima, mas 21,1% eram resistentes à eritromicina, claritromicina, azitromicina e 16,4% à tetraciclina. De doentes com infecção do tracto respiratório inferior estudaram-se 403 estirpes de *Haemophilus influenzae*, 366 de *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) e 89 de *Moraxella catarrhalis*. Demonstrou-se produção de β -lactamase em 13,1% de *H. influenzae* e 94,4% de *M. catarrhalis*. Em *S. pneumoniae* 25,1% das estirpes eram resistentes à penicilina (8,8% com resistência elevada), 14,5% à tetraciclina, 12,8% à eritromicina, claritromicina e azitromicina, e 10,1% à cefuroxima. De entre o conjunto de antibióticos ensaiado, a penicilina foi o mais activo contra *S. pyogenes* e a amoxicilina/clavulanato o mais activo simultaneamente contra *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*.

Palavra-chave: infecção respiratória, comunidade, antibióticos, resistência Portugal

*Por
convite
A.M.P.

SUMMARY

Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* from respiratory tract infections in the community in 2000

The Viriato Study is a nationwide, multicenter prospective study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens commonly associated with community-acquired respiratory tract infections in Portugal. In 2000, 28 laboratories participated in the study with a total of 1071

strains, with testing undertaken in a central laboratory. Of the 213 *Streptococcus pyogenes* strains isolated from patients with acute tonsillitis, all were susceptible to penicillin, amoxicillin/clavulanate and cefuroxime, but 21.1% were resistant to erythromycin, clarithromycin, azithromycin and 16.4% to tetracycline. From patients with lower respiratory tract infection, 403 strains of *Haemophilus influenzae*, 366 of *Streptococcus pneumoniae* and 89 of *Moraxella catarrhalis* were studied. 13.1% of *H. influenzae* and 94.4% of *M. catarrhalis* produced β -lactamase. Among *S. pneumoniae* isolates, 25.1% were resistant to penicillin (8.8% showing high-level resistance), 14.5% to tetracycline, 12.8% to erythromycin, clarithromycin and azithromycin, and 10.1% to cefuroxime. Overall, penicillin was the most active antimicrobial against *S. pyogenes* and amoxycillin/clavulanate the most active *in vitro* simultaneously against *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* isolated from patients with community-acquired LRTI in Portugal.

Key-words: community acquired respiratory tract infection, antimicrobial resistance, Portugal

INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias contam-se entre as mais prevalentes em todo o mundo. Podem ser causadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo vírus, bactérias e fungos. A espécie *Streptococcus pyogenes* é o principal e quase exclusivo agente bacteriano de amigdalofaringite aguda¹, uma das infecções mais frequentes no ambulatório. Também as espécies *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) e *Moraxella catarrhalis* se incluem entre as bactérias mais vezes responsabilizadas por infecções respiratórias adquiridas na comunidade².

A pneumonia continua a ser uma infecção potencialmente grave, com uma mortalidade compreendida entre 2 e 21%³. Os agentes etiológicos variam em vários estudos mas, em doentes sem história prévia de aspiração ou de doença do aparelho respiratório, os mais frequentes são a espécie *S. pneumoniae*, seguida das bactérias associadas a pneumonia atípica *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila*^{3,4}. Na exacerbação aguda de bronquite crónica ou de outras doenças pulmonares obstrutivas, *H. influenzae* é o agente mais vezes implicado seguindo-se, por ordem decrescente de frequência, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*, sendo comum a associação entre estes agentes^{2,4}.

Na sinusite aguda as bactérias mais frequentes são *S. pneumoniae* (20-41%) e *H. influenzae* (6-50%), isoladamente ou em associação. Outros microrganismos encontrados incluem bactérias anaeróbias (0-10%), *M. catarrhalis* (2-4%), *S. pyogenes* (1-8%) e *Staphylococcus aureus* (0-8%)². Finalmente na otite média aguda o agente mais habitual é também *S. pneumoniae* (isolado em cerca de 40% dos doentes), seguido de *H. influenzae* (27%) e de *M. catarrhalis* (10%). A associação entre *S. pneumoniae* e *H. influenzae* ocorre por vezes e outros microrganismos

implicados incluem *S. pyogenes* e *S. aureus*².

Na maioria dos casos a terapêutica é instituída empiricamente porque não se conhece o agente etiológico. As decisões para a escolha dos fármacos mais adequados devem ser baseadas no conhecimento dos agentes mais prevalentes e na susceptibilidade local aos antibióticos.

Nos últimos anos tem havido um aumento muito preocupante na resistência aos antibióticos nas principais bactérias responsáveis por infecções respiratórias. Há também variações geográficas, por vezes marcadas mesmo entre países vizinhos⁵, o que torna de importância acrescida os estudos de vigilância epidemiológica, que permitem o seu conhecimento actualizado. Neste sentido, vários têm sido realizados, destacando-se entre eles, pela extensão e abrangência, o *Projecto Alexander*⁵.

Iniciado em 1992, este estudo prospectivo foi desenvolvido para avaliar a susceptibilidade das principais bactérias responsáveis por infecções do tracto respiratório inferior a uma variedade de antimicrobianos e para analisar a evolução das resistências ao longo do tempo⁶. Nos primeiros 4 anos participaram 5 países europeus (Alemanha, Espanha, França, Itália e Reino Unido) e 5 centros nos EUA⁶. Após 1996 o projecto foi sendo alargado a muitos outros países, incluindo presentemente dezenas de centros situados nos 5 continentes. Portugal iniciou a sua participação em 1997, fornecendo anualmente cerca de 400 microrganismos isolados no Porto, Coimbra e Lisboa. Para ultrapassar limitações existentes em estudos multicêntricos anteriores, a identificação microbiana e realização dos testes de susceptibilidade aos antibióticos foram efectuados num só laboratório central, utilizando metodologia de referência e fornecendo informação quantitativa (Concentrações Inibitórias Mínimas - CIMs) para grande diversidade de antimicrobianos⁶.

Como no projecto cada país contribui anualmente com

um número interessante mas limitado de microrganismos, considerou-se importante alargar substancialmente a amostra portuguesa para permitir um melhor conhecimento da realidade nacional. Assim nasceu o Estudo Viriato, que tem uma filosofia de base idêntica à do Projecto Alexander, mas com um âmbito nacional mais alargado, permitindo o estudo de microrganismos isolados não só no Porto, Coimbra e Lisboa, mas também nos restantes distritos do País (incluindo Açores e Madeira) onde existem laboratórios disponíveis para participar. O Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa foi o centro coordenador do estudo.

O Estudo Viriato é o mais recente estudo prospectivo de âmbito nacional de vigilância epidemiológica da susceptibilidade de *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* aos antibióticos mais frequentemente utilizados na terapêutica das infecções respiratórias adquiridas na comunidade. Todas as determinações laboratoriais foram feitas no laboratório coordenador, o que permite uma comparação rigorosa dos resultados obtidos com estirpes isoladas em todo o País.

MATERIAL E MÉTODOS

Laboratórios participantes

Participaram no estudo 28 Laboratórios de Bacteriologia de todo o País, de acordo com a seguinte distribuição: **Zona Norte:** Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia; Hospital Pedro Hispano, Matosinhos; Hospital de Santa Luzia, Viana do Castelo; Hospital de Santo António, Porto; Hospital de São João, Porto; Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães e Hospital de Vila Real. **Zona Centro:** Centro Hospitalar de Coimbra; Hospital Distrital de Abrantes; Hospital Distrital de Santarém; Hospital Infante D. Pedro, Aveiro; Hospital de Santo André, Leiria; Hospital de São Teotónio, Viseu e Hospitais da Universidade de Coimbra. **Zona Sul e Ilhas:** Hospital do Barlavento Algarvio; Hospital Cruz de Carvalho, Funchal; Hospital Curry Cabral, Lisboa; Hospital Distrital de Angra do Heroísmo; Hospital do Divino Espírito Santo, Ponta Delgada; Hospital D. Estefânia, Lisboa; Hospital Garcia de Orta, Almada; Hospital Dr. José Maria Grande, Portalegre; Hospital Pulido Valente, Lisboa; Hospital dos S.A.M.S., Lisboa; Hospital de Santa Luzia, Elvas; Hospital de São Francisco Xavier, Lisboa; Hospital de São José, Lisboa e Hospital de Santa Maria, Lisboa.

As estirpes isoladas nos 28 laboratórios foram enviadas para o centro coordenador, o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, sediado no Instituto Bacteriológico Câmara Pestana, 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 *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* isoladas de produtos do aparelho respiratório (expectoração, secreções brônquicas e lavados bronco-alveolares) ou do sangue de doentes com diagnóstico clínico de infecção do tracto 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^{7,8}.

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.

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®); *H. influenzae*, morfologia das colónias e necessidade dos factores X, V e XV; *S. pneumoniae*, morfologia das colónias, susceptibilidade à optoquina e solubilidade em bñlis; *M. catarrhalis*, morfologia das colónias, prova da oxidase, produção de DNase e, ocasionalmente, utilização do sistema comercializado API NH (bioMérieux®).

Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs)

A determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) efectuou-se recorrendo à utilização de E-testes (AB Biodisk®), de acordo com as recomendações do fabricante e como referido em trabalho anterior⁹. Os antimicrobianos ensaiados foram: penicilina (apenas para *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*), ampicilina (apenas para *H. influenzae* e *M. catarrhalis*), amoxicilina / clavulanato, cefuroxima, eritromicina, claritromicina, azitromicina, tetraciclina e ciprofloxacina. Para interpretar os resultados usaram-se os valores das concentrações críticas ("breakpoints") indicados pelo NCCLS (National Committee for Clinical

Laboratory Standards)¹⁰. Sempre que a leitura das CIMs recaiu entre dois valores, foi considerado o mais elevado. Quando o valor obtido se encontrava entre os das diluições duplas tradicionais, considerou-se o valor superior mais próximo^{11,12}. 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.

Pesquisa de β-lactamase

Pesquisou-se a produção de β-lactamase utilizando como substrato a nitrocefina, com “Identification sticks β-lactamase” (Oxoid®).

RESULTADOS

Estudaram-se no total 1071 microrganismos isolados de doentes, com a seguinte distribuição: *S. pyogenes* (213 estirpes), *H. influenzae* (403), *S. pneumoniae* (366) e *M. catarrhalis* (89). Os valores de CIMs referidos incluem a CIM₅₀ (concentração inibitória mínima, em mg/L, que inibiu 50% dos microrganismos) e a CIM₉₀ (concentração inibitória mínima, em mg/L, que inibiu 90% dos microrganismos). Parte dos 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 213 estirpes de *S. pyogenes* estudadas, 156 foram isoladas de doentes de pediatria e 57 de adultos. No Quadro I apresenta-se a susceptibilidade aos antimicrobianos da totalidade das estirpes e no Quadro II apresentam-se discriminadas e comparadas as isoladas de adultos e de pediatria.

Quadro I – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 213 estirpes de S. pyogenes isoladas de doentes com amigdalofaringite em 2000 em Portugal.

Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Penicilina	0,012	0,016	0 (0,0)
Amoxicilina/clavulanato	0,016	0,016	0 (0,0)
Cefuroxima	0,016	0,016	0 (0,0)
Eritromicina	0,06	256	45 (21,1)
Claritromicina	0,06	256	45 (21,1)
Azitromicina	0,25	256	43 (21,1)
Tetraciclina	0,25	64	35 (16,4)
Ciprofloxacina	0,5	1	ND

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível

Quadro II – Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de S. pyogenes isoladas de doentes com amigdalofaringites em 2000 em Portugal: distribuição em adultos e doentes pediátricos.

Antimicrobiano	Estirpes de adultos (n=57)			Estirpes de doentes pediátricos (n=156)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Penicilina	0,012	0,016	0 (0,0)	0,012	0,016	0 (0,0)
Amoxicilina/ /clavulanato	0,016	0,016	0 (0,0)	0,016	0,016	0 (0,0)
Cefuroxima	0,016	0,016	0 (0,0)	0,016	0,016	0 (0,0)
Eritromicina	0,06	256	9 (15,8)	0,06	256	36 (23,1)
Claritromicina	0,06	256	9 (15,8)	0,06	256	36 (23,1)
Azitromicina	0,06	256	9 (15,8)	0,06	256	36 (23,1)
Tetraciclina	0,25	64	14 (24,6)	0,25	64	21 (13,5)
Ciprofloxacina	0,5	1	ND	0,5	1	ND

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível

Todos os microrganismos se revelaram altamente susceptíveis aos antibióticos β-lactâmicos (penicilina, amoxicilina/clavulanato e cefuroxima). A resistência aos macrólidos, cruzada entre os 3 ensaiados (eritromicina, claritromicina e azitromicina), foi de 21,1% e à tetraciclina de 16,4%. Apesar de as estirpes resistentes aos macrólidos o serem muitas vezes também à tetraciclina, observaram-se casos em que as duas resistências tiveram expressão independente.

Haemophilus influenzae

Foi da espécie *H. influenzae* que se estudaram mais exemplares. Dos 403 incluídos, 272 (67,5%) eram de adultos e 131 (32,5%) de pediatria. No Quadro III apresenta-se a susceptibilidade aos antimicrobianos da totalidade das

Quadro III – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 403 estirpes de H. influenzae isoladas de doentes com infecção do tracto respiratório inferior em 2000 em Portugal

Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Ampicilina	0,25	64	53 (13,1)
Amoxicilina/clavulanato	0,5	2	0 (0,0)
Cefuroxima	1	2	0 (0,0)
Eritromicina	4	4	ND
Claritromicina	8	16	47 (11,7)
Azitromicina	1	2	0 (0,0)
Tetraciclina	1	2	12 (3,0)
Ciprofloxacina	0,012	0,016	0 (0,0)

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível

Quadro IV – Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *H. influenzae* isoladas de doentes com infecção do tracto respiratório inferior em 2000 em Portugal: distribuição em adultos e doentes pediátricos.

Antimicrobiano	Estirpes de adultos (n=272)			Estirpes de doentes pediátricos (n=131)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Ampicilina	0,25	64	36(13,2)	0,25	48	17(13,0)
Amoxicilina/ /clavulanato	0,5	2	0(0,0)	0,5	2	0(0,0)
Cefuroxima	1	2	0(0,0)	1	2	0(0,0)
Eritromicina	4	4	ND	4	8	ND
Claritromicina	8	8	24(8,8)	8	16	23(17,6)
Azitromicina	1	2	0(0,0)	2	2	0(0,0)
Tetraciclina	1	2	9(3,3)	1	2	3(2,3)
Ciprofloxacina	0,012	0,023	0(0,0)	0,012	0,016	0(0,0)

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível

estirpes e no Quadro IV apresentam-se discriminadas e comparadas as isoladas de adultos e de pediatria.

O mecanismo de resistência mais frequente foi a produção de β-lactamase, demonstrada em 13,1% dos casos, o que esteve de acordo com a frequência da resistência à ampicilina. Não se isolaram estirpes não produtoras de β-lactamase e resistentes à ampicilina. Para além da ampicilina, encontraram-se resistências em poucas estirpes apenas a outros dois antibióticos, claritromicina (47 estirpes, 11,7%) e tetraciclina (12 estirpes, 3,0%). Todos os microrganismos eram susceptíveis à amoxicilina/clavulanato, cefuroxima, azitromicina e ciprofloxacina.

Quadro V – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 366 estirpes de *S. pneumoniae* isoladas de doentes com infecção do tracto respiratório inferior em 2000 em Portugal.

Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Penicilina	0,023	1	92 (25,1)
Amoxicilina/clavulanato	0,016	1	3 (0,8)
Cefuroxima	0,023	1	37 (10,1)
Eritromicina	0,06	32	47 (12,8)
Claritromicina	0,03	16	47 (12,8)
Azitromicina	0,125	32	47 (12,8)
Tetraciclina	0,125	32	53 (14,5)
Ciprofloxacina	1	2	ND

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível

Quadro VI – Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *S. pneumoniae* isoladas de doentes com infecção do tracto respiratório inferior em 2000 em Portugal: distribuição em adultos e doentes pediátricos

Antimicrobiano	Estirpes de adultos (n=281)			Estirpes de doentes pediátricos (n=85)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Penicilina	0,023	1	59(21,0)	0,023	1	33(38,8)
Amoxicilina/ /clavulanato	0,016	1	2(0,7)	0,016	1	1(1,2)
Cefuroxima	0,023	2	29(10,3)	0,023	1	8(9,4)
Eritromicina	0,06	4	32(11,4)	0,06	256	15(17,6)
Claritromicina	0,03	4	32(11,4)	0,03	256	15(17,6)
Azitromicina	0,125	8	32(11,4)	0,125	256	15(17,6)
Tetraciclina	0,125	16	36(12,8)	0,25	32	17(20,0)
Ciprofloxacina	1	2	ND	1	2	ND

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível; ns, não significativo

Streptococcus pneumoniae

Das 366 estirpes de *S. pneumoniae* incluídas no estudo, 281 (76,8%) foram isoladas de adultos e 85 (23,2%) de doentes pediátricos. No Quadro V apresenta-se a susceptibilidade aos antimicrobianos da sua totalidade e no Quadro VI apresentam-se discriminadas e comparadas as estirpes de adultos e de pediatria. A maioria dos microrganismos (255, 72,4%) era susceptível a todos os antibióticos ensaiados.

Nesta bactéria definem-se dois patamares de resistência à penicilina, a resistência intermédia, caracterizada por valores de CIM ≥ 0,1 mg/L e < 2 mg/L, e a resistência elevada, definida por valores de CIM ≥ 2 mg/L¹³. Demonstrou-se haver susceptibilidade diminuída à penicilina em 92 (25,1%) casos, dos quais 67 (18,3%) revelaram resistência intermédia e 25 (6,8%) resistência elevada. Todos os microrganismos com resistência elevada à penicilina eram igualmente resistentes a pelo menos mais um antimicrobiano. Verificou-se resistência a antimicrobianos em estirpes susceptíveis à penicilina em 19 (5,2 %) casos: eritromicina, claritromicina e azitromicina (11 estirpes), eritromicina, claritromicina, azitromicina e tetraciclina (8 estirpes).

Moraxella catarrhalis

A susceptibilidade aos antimicrobianos das 89 estirpes de *M. catarrhalis* (49 de adultos e 40 de doentes pediátricos) está apresentada no Quadro VII e no Quadro VIII estão discriminadas as estirpes de adultos e de pediatria.

Quadro VII – Susceptibilidade aos antimicrobianos de 89 estirpes de *M. catarrhalis* isoladas de doentes com infecção do tracto respiratório inferior em 2000 em Portugal.

Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Ampicilina	2	4	84 (94,4)
Amoxicilina /clavulanato	0,125	0,25	0 (0,0)
Cefuroxima	1	2	0 (0,0)
Eritromicina	0,25	0,5	ND
Claritromicina	0,125	0,5	0 (0,0)
Azitromicina	0,06	0,125	0 (0,0)
Tetraciclina	0,5	1	0 (0,0)
Ciprofloxacina	0,03	0,06	0 (0,0)

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível

Quadro VIII – Susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *M. catarrhalis* isoladas de doentes com infecção do tracto respiratório inferior em 2000 em Portugal: distribuição em adultos e doentes pediátricos

Antimicrobiano	Estirpes de adultos (n=49)			Estirpes de doentes pediátricos (n=40)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)	CIM ₅₀	CIM ₉₀	R (%)
Ampicilina	2	4	45 (91,8)	2	4	39 (97,5)
Amoxicilina/ /clavulanato	0,125	0,5	0 (0,0)	0,06	0,25	0 (0,0)
Cefuroxima	1	1	0 (0,0)	2	2	0 (0,0)
Eritromicina	0,25	0,5	ND	0,25	0,5	ND
Claritromicina	0,125	0,25	0 (0,0)	0,125	0,25	0 (0,0)
Azitromicina	0,06	0,125	0 (0,0)	0,06	0,125	0 (0,0)
Tetraciclina	0,5	1	0 (0,0)	0,5	1	0 (0,0)
Ciprofloxacina	0,06	0,06	0 (0,0)	0,03	0,06	0 (0,0)

CIM₅₀ e CIM₉₀ (mg/L); R (%), % resistência; ND, não disponível

Demonstrou-se produção de β-lactamase em 94,4 % dos microrganismos, considerados resistentes à ampicilina. 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 frequentemente referido na literatura^{14,15}. Todas as estirpes se revelaram altamente susceptíveis à amoxicilina / clavulanato, cefuroxima, claritromicina, azitromicina, tetraciclina e ciprofloxacina.

Distribuição geográfica

A distribuição geográfica da susceptibilidade aos antimicrobianos deverá ser apreciada com prudência,

devido à grande assimetria no número de estirpes proveniente de cada região.

Em *S. pyogenes* estudaram-se 19 microrganismos da Região Norte, 26 da Região Centro e 168 da Região Sul e Ilhas. As percentagens de resistência aos macrólidos foram de 10,5 %, 26,9 % e 21,4 % e à tetraciclina de 5,3 %, 19,2 % e 17,3 % respectivamente.

Das 403 estirpes de *H. influenzae*, 142 foram isoladas no norte, 27 no centro e 234 no sul e ilhas. A produção de β-lactamase observou-se respectivamente em 13,4%, 7,4% e 13,7% dos microrganismos.

A origem das 366 estirpes de *S. pneumoniae* foi a seguinte: 151 no norte, 34 no centro e 181 no sul e ilhas. A resistência percentual à penicilina foi de 21,9 %, 17,6 % e 29,3 %, aos macrólidos de 10,6 %, 8,8 % e 15,5 % e à tetraciclina de 14,6 %, 5,9 % e 16,0 % respectivamente.

Finalmente em relação a *M. catarrhalis* a quase totalidade das estirpes era produtora de β-lactamase, a saber, 96,7 % das 30 isoladas no norte, todas as 7 isoladas no centro e 92,3% das 48 isoladas no sul e ilhas.

DISCUSSÃO

O Estudo Viriato foi desenvolvido face à necessidade de um conhecimento prospectivo actualizado, de âmbito nacional, da susceptibilidade aos antimicrobianos das principais bactérias responsáveis por infecções do tracto respiratório adquiridas na comunidade. Este é particularmente importante não só porque tem sido referido um aumento recente e muito preocupante nas resistências, como também porque há variação significativa na sua prevalência entre países vizinhos¹⁴.

O conhecimento actualizado da realidade local é um contributo valioso para fundamentar a escolha dos antibióticos para a terapêutica, que é quase sempre empírica. Embora haja alguma variação percentual nos estudos sobre a etiologia das infecções respiratórias agudas, as bactérias mais importantes são constantes e, mesmo nos melhores centros, o agente etiológico só é identificado em 30 a 50% dos casos em que é efectuado exame microbiológico². Pelo contrário, a susceptibilidade aos antimicrobianos das principais bactérias é bem conhecida mas pode variar de forma muito acentuada ao longo do tempo¹⁴. A comparação da evolução das resistências no tempo e em regiões geográficas distintas permite ainda uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelo seu aparecimento, evolução e disseminação.

Uma das espécies incluídas no presente estudo, *S. pyogenes* ou *Streptococcus β-haemolyticus* do Grupo A de Lancefield, é a bactéria responsável por amigdalites e faringites agudas, embora possa também estar envolvida

noutras infecções respiratórias. Todos os microrganismos eram altamente susceptíveis à penicilina ($CIM_{90} = 0,016$ mg/L) e aos restantes antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina / clavulanato e cefuroxima), como seria de esperar, dado que não foram ainda descritas resistências à penicilina em estirpes isoladas de doentes. Apesar da susceptibilidade constante *in vitro*, foram já assinalados insucessos terapêuticos com a penicilina, explicados pela produção local de bacteriocinas, produção de β -lactamases por bactérias da flora indígena oral, ou por mecanismos microbianos de tolerância^{16,17}. No entanto, 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 custo¹⁸. Nos casos de alergia apontam-se os macrólidos como alternativa^{18,19}. Contudo, em países europeus como a Finlândia²⁰, Itália²¹ e Espanha²², documentou-se um aumento muito expressivo na prevalência da resistência, situação idêntica à recentemente verificada em Portugal⁹. No presente estudo 21,1% das estirpes eram resistentes a todos os macrólidos ensaiados, eritromicina, claritromicina e azitromicina. Vários autores associam o aumento de estirpes resistentes ao uso excessivo de eritromicina e dos novos macrólidos no tratamento de amigdalofaringites agudas²³⁻²⁶. Demonstrou-se ainda que a redução no seu uso se associou a uma diminuição significativa da taxa de resistência em *S. pyogenes*^{24,26}. Estes factos, associados à actual prevalência elevada de resistência à eritromicina, claritromicina e azitromicina das estirpes isoladas em Portugal, permitem concluir que não devem utilizar-se macrólidos na terapêutica empírica da amigdalofaringite aguda no País, porque a probabilidade de insucesso terapêutico é elevada⁹.

O recurso às tetraciclinas para a terapêutica das infecções estreptocócicas é ainda utilizado nalguns países¹⁹, mas é uma prática que coloca reservas não só porque se demonstrou que as tetraciclinas nem sempre erradicam o microrganismo da faringe, mesmo as estirpes susceptíveis¹⁸, como também porque em locais onde a prevalência da resistência é importante, como é o caso de Portugal (16,4 %), elas não devem ser consideradas. Finalmente, as acções indesejáveis que desaconselham a utilização em crianças excluem-nas das opções para o uso empírico nas amigdalofaringites na infância.

Nas bactérias de infecções do tracto respiratório inferior devem realçar-se as principais resistências encontradas em 2000: 13,1% de *H. influenzae* e 94,4 % de *M. catarrhalis* eram produtores de β -lactamase e, em *S. pneumoniae*, 25,1 % tinham susceptibilidade diminuída à penicilina, 14,5% eram resistentes à tetraciclina, 12,8% aos macrólidos

(eritromicina, claritromicina e azitromicina) e 10,1% à cefuroxima. A prevalência da resistência em Portugal, apesar da proximidade geográfica, foi muito distinta da recentemente observada em outros países do sudoeste da Europa, como são exemplos elucidativos a produção de β -lactamase por *H. influenzae*, que atingiu valores de 26-32% em Espanha e de 19-20% em França mas apenas 2% na Itália¹⁴, e a susceptibilidade diminuída à penicilina em *S. pneumoniae*, que foi de 50-58% em França, 41-51% em Espanha e somente 7-9% em Itália¹⁴.

A resistência aos antibióticos em *H. influenzae* não tem aumentado em Portugal na última década. O valor actual de estirpes produtoras de β -lactamase é semelhante ao de estudos efectuados em 1992²⁷ e 1997²⁸, onde foi respectivamente de 11,2% e 12,6%. Apesar da diferença no limite da idade, o valor encontrado foi idêntico ao referido num estudo recente efectuado com microrganismos isolados na nasofaringe de crianças saudáveis de creches de Lisboa (20 %)²⁹.

A resistência à tetraciclina foi baixa (3,0 %) e todas as estirpes se revelaram susceptíveis à amoxicilina/clavulanato, cefuroxima, azitromicina e ciprofloxacina. Relativamente à prevalência das principais resistências nas diferentes regiões geográficas consideradas, há apenas a salientar a menor percentagem de estirpes produtoras de β -lactamase na região centro.

Nos macrólidos encontrou-se uma resistência de 11,7% à claritromicina e ausência de resistência *in vitro* à azitromicina. No entanto, a questão da susceptibilidade aos macrólidos e sua utilização terapêutica nestes casos é assunto ainda controverso. A curva de distribuição monomodal dos valores das CIMs sugere que esta espécie tem uma susceptibilidade intrínseca baixa, que não pode ser considerada resistência adquirida³⁰. O NCCLS¹⁰ não indica valores de concentrações críticas para definir susceptibilidade ou resistência à eritromicina em *Haemophilus* spp., o que não facilita a análise. No entanto, estes valores são indicados para a claritromicina e azitromicina. Como salientou Carbon³¹, o uso de macrólidos em monoterapia para o tratamento empírico de infecções do tracto respiratório inferior é muito questionável. A resistência em *S. pneumoniae* tem vindo a subir e é actualmente uma realidade preocupante em vários países. Os macrólidos têm uma actividade intrínseca baixa contra *H. influenzae*, a sua actividade é reduzida num ambiente em que há diminuição do pH, como acontece no tracto respiratório durante o processo infeccioso, e acumulam-se essencialmente dentro das células, atingindo concentrações baixas no espaço extracelular, onde se encontram as bactérias patogénicas mais importantes³¹. Conclui o autor

que os macrólidos devem usar-se na terapêutica da infecção respiratória do tracto inferior apenas quando não houver suspeita de infecção por *S. pneumoniae* e quando os agentes mais prováveis forem *Mycoplasma*, *Chlamydia* ou *Legionella*³¹.

Ao contrário do que se verificou em *H. influenzae*, houve um aumento importante na resistência aos antibióticos em *S. pneumoniae* (ou *Pneumococcus*). Num estudo multicêntrico português³² demonstrou-se que em estirpes isoladas entre 1989 e 1993 a resistência à penicilina tinha aumentado respectivamente de 4,6% para 18% e, no ano de 1993, a resistência elevada tinha atingido 5,5%³². Em 1997, primeiro ano de participação de Portugal no Projecto Alexander, verificou-se que a resistência à penicilina atingia os 20,3%²⁸. No presente estudo, o valor é ainda mais elevado, 25,1% (18,3% resistência intermédia e 6,8% resistência elevada), documentando uma subida mantida. Apesar de a utilização de antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente de penicilina, continuar a ser considerada a terapêutica de eleição nas infecções respiratórias de etiologia pneumocócica, incluindo as causadas por estirpes resistentes^{33,34}, o aumento na prevalência destes microrganismos é uma realidade preocupante, porque frequentemente as estirpes são também resistentes a outros antibióticos^{14,32}, como se verificou no presente estudo. Embora nos encontrermos muito acima da situação na Itália (em que a resistência é inferior a 10%), estamos ainda distantes dos valores recentes de Espanha e França, que ultrapassam os 50%¹⁴.

Em pneumococos a subida mais acentuada foi na resistência aos macrólidos. No trabalho de 1989-1993, os valores foram sempre inferiores a 4%³² e também no estudo de 1997 apenas 3,5% das estirpes revelaram resistência a esta classe de antibióticos o que, à data, foi salientado como um dos valores mais baixos da Europa²⁸. A situação mudou consideravelmente e a resistência atingiu 12,8% no presente estudo. Confirmou-se ainda que ela é cruzada, afectando os 3 macrólidos estudados, eritromicina, claritromicina e azitromicina.

Para além da penicilina e dos macrólidos, verificaram-se ainda valores de resistência de 10,1% à cefuroxima e de 14,5% à tetraciclina. Para a amoxicilina / clavulanato a resistência foi de apenas 0,8 %. Recordar-se que, para a terapêutica das infecções por pneumococos, não há benefício na adição do ácido clavulânico à amoxicilina, porque o mecanismo de resistência não é a produção de β -lactamases. Será, por isto, de considerar que a amoxicilina isoladamente terá eficácia idêntica à amoxicilina / clavulanato.

Valores recentes encontrados em estirpes isoladas de

crianças saudáveis foram de 24% de resistência à penicilina e de 17% à eritromicina²⁹. Será interessante saber se as estirpes que colonizam a nasofaringe são também as que mais vezes são responsáveis por infecção.

ONCCLS¹⁰ não indica valores de concentrações críticas para definir susceptibilidade e resistência em *S. pneumoniae* à ciprofloxacina, o que prejudica a avaliação da eficácia desta quinolona. Contudo, apesar de as novas quinolonas serem muito activas contra *S. pneumoniae*, a ciprofloxacina não deve ser considerada uma escolha útil para o tratamento das infecções pneumocócicas devido à sua actividade moderada contra o microrganismo^{2,35}. Como tem sido salientado, é provável que os microrganismos, quando sujeitos a pressão selectiva induzida pela terapêutica, possam adquirir várias mutações sequenciais responsáveis por resistência³⁵. É por isto recomendada uma monitorização cuidada da susceptibilidade de *S. pneumoniae* às novas quinolonas para poder avaliar o seu real valor terapêutico³⁵. Relativamente à distribuição geográfica, foi no sul e ilhas que se encontrou maior resistência à penicilina, aos macrólidos e à tetraciclina.

As estirpes de *M. catarrhalis* produziram β -lactamase em 94,4 % dos casos, não obstante o reduzido número da amostra. Este valor foi ainda superior ao encontrado em 1997 (85%)²⁸. Apesar de já terem sido descritas resistências a diversos antimicrobianos³⁶, a produção de β -lactamase foi o único mecanismo de resistência encontrado, o que tem sido descrito em estudos recentes de âmbito idêntico^{14,15,29,37}. Com base nestes dados pode dizer-se que, actualmente, as estirpes de *M. catarrhalis* são resistentes à penicilina, ampicilina e amoxicilina devido à produção de β -lactamase e susceptíveis a todos os restantes antimicrobianos potencialmente úteis na terapêutica das infecções respiratórias, incluindo β -lactâmicos, macrólidos, tetraciclinas e quinolonas.

Tendo em consideração os resultados das provas de susceptibilidade a todos os antibióticos incluídos no presente estudo, a penicilina continua a ser o fármaco de eleição para a terapêutica da amigdalite aguda causada por *S. pyogenes* e a associação amoxicilina / clavulanato é, na actualidade, o fármaco mais activo simultaneamente contra *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis* isolados de doentes com infecções do tracto respiratório inferior adquiridas na comunidade em Portugal.

Devido ao aumento crescente da resistência aos antibióticos mais úteis na terapêutica, é urgente o desenvolvimento de novos fármacos. Neste âmbito, anunciam-se como promissores, entre outros, novas fluoroquinolonas, novos macrólidos ou compostos relacionados e novas tetraciclinas. Contudo, serão

necessários mais estudos clínicos e epidemiológicos para demonstrar a sua segurança e real eficácia. Entretanto, o sucesso da terapêutica só pode ser garantido com a utilização racional dos antibióticos já bem conhecidos e de uso corrente.

O presente trabalho procura ser um contributo, baseado em dados microbiológicos de mais de um milhar de estirpes, para a escolha dos antibióticos mais adequados à terapêutica empírica das infecções respiratórias bacterianas adquiridas na comunidade em Portugal. Como se têm verificado variações rápidas e por vezes acentuadas na prevalência das 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. Os dados referentes ao primeiro ano (1999) foram recentemente divulgados³⁸, tendo sido apresentados no presente trabalho os resultados obtidos no segundo ano do estudo.

** Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias:

Centro Hospitalar de Coimbra: João Sarabando Moreira, Ana Florinda Alves; **Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia:** Paulo Lopes, Ismália Calheiros, Luísa Felício, Cacilda Magalhães, Lourdes Sobral; **Hospital do Barlavento Algarvio:** Teresa Vaz, Marília Gião; **Hospital Cruz de Carvalho, Funchal:** Teresa Afonso; **Hospital Curry Cabral, Lisboa:** Maria José Silvestre, Helena Peres, Teresa Pina; **Hospital Distrital de Abrantes:** Clotilde Roldão; **Hospital Distrital de Angra do Heroísmo:** Jacinta Dantas, Rui Farto; **Hospital Distrital de Santarém:** Leonor Palma; **Hospital do Divino Espírito Santo, Ponta Delgada:** Eulália Santos, Karyne Hyde; **Hospital Infante D. Pedro, Aveiro:** António Rodrigues, Américo de Freitas; **Hospital D. Estefânia, Lisboa:** Rosa M. Barros, Maria Isabel Peres; **Hospital Garcia de Orta, Almada:** José Diogo, Ana Rodrigues, Margarida Pinto; **Hospital Dr. José Maria Grande, Portalegre:** Maria Paula Pinheiro, Rui Semedo; **Hospital Pedro Hispano, Matosinhos:** Valquíria Alves, Antónia Read; **Hospital de Pulido Valente, Lisboa:** Margarida Abecassis, Helena Troni, Mário Pádua; **Hospital dos S.A.M.S., Lisboa:** Luísa Cabral, Olga Pires Neto; **Hospital de Santa Luzia, Viana do Castelo:** Fernando Fonseca; **Hospital de Santa Luzia, Elvas:** Ilse Fontes; **Hospital de Santa Maria, Lisboa:** Melo Cristino, Luís Lito, Maria José Salgado; **Hospital de Santo André, Leiria:** Luísa Ferreira; **Hospital de Santo António, Porto:** Ana Paula Castro, Maria João Soares, Maria Helena Ramos, José Manuel Amorim; **Hospital de São Francisco Xavier, Lisboa:** Filomena Martins, Maria ana Pessanha, Marta Prata, Elsa Gonçalves; **Hospital de São João, Porto:** Maria José Machado Vaz, Cristina Gouveia, J. Correia da Fonseca; **Hospital de São José, Lisboa:** Maria Odete Spencer, Luísa Ferro, João Marques, Orbelino Araújo; **Hospital de São Teotónio, Viseu:** Isabel Marques, José Miguel Ribeiro,

João Ribeiro; **Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães:** Paula Mota Vieira, Francisco Botelho Moniz; **Hospitais da Universidade de Coimbra:** Rosa Velho, Luísa Boaventura, R. Tomé, Dário Costa; **Hospital de Vila Real:** Ana Paula Castro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o inextinguível trabalho técnico de Leticia Santos e Olívia Cruz. A concretização do presente estudo foi possível graças à atribuição de uma bolsa pela SmithKline Beecham Farmacêutica, Portugal.

BIBLIOGRAFIA

- CUNNINGHAM MW: Pathogenesis of Group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:470-511
- GOLDSTEIN F, BRYSKIER A, APPELBAUM PC, BAUERNFEIND A, JACOBS M, SCHITO GC, WISE R: The etiology of respiratory tract infections and the antibacterial activity of fluoroquinolones and other oral antibacterial agents against respiratory pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* 1998;4 (Suppl. 2):2S8-2S18
- FINE Jr JM: Aetiology and incidence of community-acquired pneumonia. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 1996;5 (Suppl. 4):S127-S135
- BALL P: Epidemiology and treatment of chronic bronchitis and its exacerbations. *Chest* 1995;108:435-452S
- FELMINGHAM D, WASHINGTON J, the Alexander Project Group: Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial respiratory tract pathogens – Findings of the Alexander Project 1992-1996. *Chemotherapy* 1999;11(Suppl.1):5-21
- FELMINGHAM D, GRÜNEBERG RN, the Alexander Project Group: A multicenter collaborative study of the antimicrobial susceptibility of community-acquired, lower respiratory tract pathogens 1992-1993: The Alexander Project. *Antimicrobial Chemotherapy* 1996;38 (Suppl. A):1-57
- BARTLETT RC, MAZENS-SULLIVAN M, TETREAUULT JZ, LOBEL S, NIVARD J: Evolving approaches to management of quality in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 1994;7:55-88
- BARENFANGER J: Quality in, quality out: Rejection criteria and guidelines for commonly (mis)used tests. *Clinical Microbiology Newsletter* 2000;22:65-72
- 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
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Fifth edition supplement M100-S10(M7). Wayne, PA
- HSUEH P R, LIU YC, SHYR JM, WU TL, YAN JJ, WU JJ, LEU HS, CHUANG YC, LAU, YJ, LUH KT: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during 1998-1999 respiratory season. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:1342-1345

12. ROWE AK, SCHWARTZ B, WASAS A, KLUGMAN KP: Evaluation of the E-test as a means of determining the antibiotic susceptibilities of isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in the Central African Republic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000;45:132-134
13. JACOBS MR, APPELBAUM PC: Antibiotic resistant pneumococci. *Reviews in Medical Microbiology* 1995;6:77-93
14. FELMINGHAM D, GRÜNEBERG RN AND THE ALEXANDER PROJECT GROUP: The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000;45:191-203
15. ZHANEL GG, KARLOWSKY JA, LOW DE, THE CANADIAN RESPIRATORY INFECTION STUDY GROUP AND HOBAN DJ: Antibiotic resistance in respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from across Canada in 1997-1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000;45:655-662
16. BROOK I: The role of β -lactamase producing bacteria in the persistence of streptococcal tonsillar infection. *Reviews of Infectious Diseases* 1984;6:601-607
17. ROOS K, HOLM SE, EKEDAHL C: Treatment failure in acute streptococcal tonsillitis in children over the age of 10 and in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1985;17:357-365
18. 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
19. KAPLAN EL: Recent evaluation of antimicrobial resistance in β -haemolytic streptococci. *Clinical Infectious Diseases* 1997;24 (Suppl. 1):S89-S92
20. KATAJA J, HOUVINEN P, MOUTIALA A, VUOPIO-VARKILA J, EFSTRAITOU A, HALLAS G, THE FINNISH GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND SEPÄLÄ H: Clonal spread of group A streptococcus with the new type of erythromycin resistance. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:786-789
21. CORNAGLIA G, LIGOZZI M, MAZZARIOL A, MASALA L, CASCIO GL, OREFICI G, THE ITALIAN SURVEILLANCE GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE, AND FONTANA R: Resistance of *Streptococcus pyogenes* to erythromycin and related antibiotics in Italy. *Clinical Infectious Diseases* 1998;27 (Suppl.1): S87-S92
22. PEREZ-TRALLERO E, MARIMÓN JM, MONTES M, ORDEN B, PABLOS M: Clonal differences among erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Emerging Infectious Diseases* 1999;5:235-240
23. BASSETTI M, MANTERO E, GATTI G, DI BIAGIO A, BASSETTI D: *Streptococcus pyogenes* erythromycin resistance in Italy. *Emerging Infectious Diseases* 1999;5:302-303
24. CORNAGLIA G, LIGOZZI M, MAZZARIOL A, VALENTINI M, OREFICI G, THE ITALIAN SURVEILLANCE GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND FONTANA R: Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993-1995. *Emerging Infectious Diseases* 1996;2:339-342
25. HSUEH, P R, CHEN H M, HUANG A H, WU J J: Decreased activity of erythromycin against *Streptococcus pyogenes* in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995;39:2239-2242
26. SEPÄLÄ H, KLAUKKA T, VUOPIO-VARKILA J, MOUTIALA A, HELENIUS H, LAGER K, HOUVINEN P, AND THE FINNISH STUDY GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE: The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. *New England Journal of Medicine* 1997;337:441-446
27. 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 Antimicrobial Chemotherapy* 1996;38:615-625.
28. MELO CRISTINO J, FERNANDES ML, E O GRUPO DE ESTUDO PORTUGUÊS DO PROGRAMA "ALEXANDER": Projecto "Alexander": Estudo multicêntrico internacional de susceptibilidade aos antimicrobianos das principais bactérias responsáveis por infecção respiratória baixa na comunidade. O primeiro ano da participação de Portugal. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 1998;4:581-590
29. DE LENCASTRE H, KRISTINSSON KG, BRITO-AVÔ A, SANCHES IS, SÁ-LEÃO R, SALDANHA J, SIGVALDADOTTIR E, KARLSSON S, OLIVEIRA D, MATO R, DE SOUSA MA, TOMASZ A: Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *Microbial Drug Resistance* 1999;5:19-29
30. BAQUERO F: Trends in antibiotic resistance of respiratory pathogens: an analysis and commentary on a collaborative surveillance study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996 (Suppl. A);38:117-132
31. CARBON C, POOLE MD: The role of newer macrolides in the treatment of community-acquired respiratory tract infection. A review of experimental and clinical data. *Journal of Chemotherapy* 1999;11:107-118
32. 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
33. GOLDSTEIN FW: Choice of an oral β -lactam antibiotic for infections due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1997;29:255-257
34. CRAIG WA. Antimicrobial resistance issues of the future. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 1996;25:213-217
35. LEGG JM, BINT AJ: Will pneumococci put quinolones in their place? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999;44:425-427
36. CHRISTENSEN JJ: *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*: Clinical, microbiological and immunological features in lower respiratory tract infections. *APMIS* 1999;107 (Suppl. 88):1-36
37. CRITCHLEY IA, THORNSBERRY C, PIAZZA G, JONES M, HICKEY ML, BARTH AL, MENDES C, ROSSI FF, SADER HS, TEIXEIRA LM, SAHM DF: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from five centers in Brazil, 1997-98. *Clinical Microbiology and Infection* 2000;6:178-184
38. 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