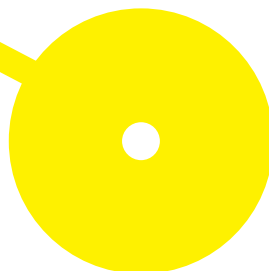


M

BIOQUÍMICA EM SAÚDE
BIOTECNOLOGIA

Deteção da suscetibilidade
antimicrobiana por citometria
de fluxo diretamente a partir
de amostras de urina infetadas
Joana Rita dos Santos Oliveira

12/2018



P. PORTO

Escola Superior de Saúde

Instituto Politécnico do Porto

Joana Rita dos Santos Oliveira

**Deteção da suscetibilidade antimicrobiana por
citometria de fluxo diretamente a partir de
amostras de urina infetadas**

Mestrado em Bioquímica em Saúde

Dezembro 2018



Escola Superior de Saúde

Instituto Politécnico do Porto

Joana Rita dos Santos Oliveira

Deteção da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras de urina infetadas

Relatório de estágio submetido à Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo em Biotecnologia, realizado sob orientação científica da Professora Doutora Cidália Pina Vaz, Professora de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e orientação institucional da Professora Doutora Cristina Prudêncio, Coordenadora do Curso de Mestrado em Bioquímica em Saúde, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Dezembro 2018

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que este estágio fosse realizado. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

À Professora Doutora Cidália Pina Vaz devo o profundo agradecimento pela sua orientação, disponibilidade, pelo saber transmitido, apoio e ajuda na elaboração deste trabalho. Obrigada por me ter recebido de braços abertos, pelas alegrias, momentos felizes, pelo afastamento das incertezas e essencialmente pela compreensão.

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, pelo conhecimento transmitido, pela ajuda, apoio e conselhos dados na procura de estágio.

À Professora Mónica Vieira pela compreensão, ajuda e conselhos dados ao longo desta etapa.

A toda a equipa da FASTinov S.A. pela forma como fui recebida, pela simpatia, boa disposição, ajuda, apoio e pelo bom ambiente criado. Um agradecimento especial à Doutora Rita Santos pela compreensão e ajuda, pelo apoio e incentivos nos momentos certos desta árdua e longa caminhada.

Ao Professor Doutor Acácio Rodrigues, diretor do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, por me deixar utilizar as instalações e pela cordialidade com que me recebeu. Bem como, a todos os investigadores e funcionários deste serviço, pela disponibilidade, boa disposição e pelo bom ambiente criado.

Ao Laboratório Dr. Carlos Torres do Grupo UNILABS do Porto e ao Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto pela colaboração e oportunidade de realizar o estudo ao fornecerem as amostras clínicas de urina.

A todos os meus amigos que estiveram ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, força, conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Ao Xavier Oliveira por estar sempre ao meu lado durante esta fase, pelo apoio incondicional, pelos sermões, incentivos, por acreditar em mim e pela força que me deu para nunca desistir de mim e dos meus sonhos.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais, pelo apoio, amizade, paciência, incentivo, pelos conselhos, por me inculcarem que é possível realizar os nossos sonhos por mais obstáculos que apareçam na vida, o que importa é nunca desistir.

Resumo

As infecções do trato urinário são das infecções mais comuns em todo o mundo, sendo provocadas maioritariamente por bactérias, nomeadamente por bacilos Gram-negativo. O diagnóstico microbiológico destas infecções demora pelo menos 48 horas, obrigando à instituição de terapêutica empírica que nem sempre é a mais adequada.

Neste estudo, pretendeu-se desenvolver um método rápido para determinar a suscetibilidade aos antibacterianos por citometria de fluxo, diretamente a partir de amostras de doentes com ITU, de modo a permitir a instituição da terapêutica adequada à situação clínica. Para tal, começou-se por validar os *kits* da FASTinov[®] gramneg para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos, previamente desenvolvidos, em urinas inoculadas com estirpes padrão. Procedeu-se à seleção das amostras clínicas de urina, positivas para bacilos Gram-negativo, utilizando o citómetro de fluxo Sysmex UF-1000i e avaliando a sua acuidade. Nestas amostras positivas otimizou-se um protocolo de extração dos microrganismos de forma a obter uma suspensão pura e com concentração bacteriana suficiente para iniciar a inoculação do *kit* (0,5 McFarland). A partir desta suspensão foi realizada a identificação do microrganismo por espetrometria de massa, MALDI-TOF. No fim, foi realizada uma prova de conceito em 10 amostras clínicas positivas no *screening* efetuado pelo Sysmex UF-1000i, procedendo-se à sua identificação e à determinação do perfil de suscetibilidade pelos métodos descritos anteriormente. Os resultados foram comparados com o método de rotina.

Relativamente ao *kit* FASTinov[®] gramneg obteve-se uma proporção de concordância de 92,7% e 92,0% para os protocolos EUCAST e CLSI, respetivamente quando comparado com os métodos clássicos. Na avaliação do Sysmex UF-1000i verificou-se que houve diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,044$) entre a contagem do equipamento e a determinação de UFC, mas essas não excederam um logaritmo (bactérias/mL). Sendo assim, o Sysmex UF-1000i mostrou ser promissor na seleção das amostras positivas para bacilos Gram-negativo. Na identificação dos microrganismos diretamente a partir da urina usando a espetrometria de massa MALDI-TOF houve uma boa concordância com a identificação pelos métodos de rotina sendo a espécie predominante *Escherichia coli*. Na prova de conceito 10 amostras clínicas foram identificadas como *Escherichia coli* (30 %), *Klebsiella pneumoniae* (30 %), *Proteus mirabilis* (30 %) e os restantes 10 % como *Enterobacter cloacae*. Verificou-se uma proporção de concordância entre o *kit* FASTinov[®] gramneg e os

métodos de rotina de 95,0% para o protocolo EUCAST (protocolo utilizado nos laboratórios Portugueses).

Com este trabalho, foi possível criar um método diagnóstico rápido (cerca de 2 horas) combinando o *screening* das amostras de urina pelo Sysmex UF-1000i, a identificação do microrganismo por MALDI-TOF e a determinação da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo usando o *kit* FASTinov[®] gramneg, possibilitando o tratamento dirigido. No entanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar os resultados obtidos.

Palavras-chave: diagnóstico de infecções do trato urinário, bacilos Gram-negativo, MALDI-TOF, citometria de fluxo, testes de suscetibilidade antimicrobiana

Abstract

Urinary tract infections are among the most common infections worldwide, being caused mainly by bacteria, namely Gram-negative bacilli. The microbiological diagnosis of these infections takes at least 48 hours, forcing the institution of empirical therapy that is not always the most appropriate.

In this study, it was intended to develop a rapid method to determine antibacterial susceptibility by flow cytometry, directly from samples of patients with UTIs, in order to allow the institution of the appropriate therapy to the clinical situation. To this end, FASTinov[®] gramneg kits for the evaluation of susceptibility to antimicrobials, previously developed, were started in inoculated urine with standard strains. Urine samples positive for Gram-negative bacilli, were selected using the Sysmex UF-1000i flow cytometer, evaluating its accuracy. In these positive samples a protocol of extraction of the microorganisms was optimized in order to obtain a pure suspension and with sufficient bacterial concentration to initiate the inoculation of the kit (0.5 McFarland). From this suspension, the microorganism was identified by mass spectrometry, MALDI-TOF. In the end, a proof of concept was performed on 10 clinical samples screened positive by Sysmex UF-1000i, identified and the susceptibility profile evaluated by the methods described above. The results were compared with the routine method.

For the FASTinov[®] gramneg kit, a concordance ratio of 92.7% and 92.0% was achieved for the EUCAST and CLSI protocols, respectively. In the evaluation of the Sysmex UF-1000i, there were statistically significant differences ($p = 0.044$) between the counting of the equipment and the determination of CFU, but did not exceed one logarithm (bacteria/mL). Thus, the Sysmex UF-1000i showed to be promising in the selection of Gram-negative bacilli positive samples. In the identification of the microorganisms directly from the urine using MALDI-TOF mass spectrometry, there was good agreement with the identification by routine methods being the predominant species *Escherichia coli*. In the proof of concept, the samples were identified as *Escherichia coli* (30 %), *Klebsiella pneumoniae* (30 %), *Proteus mirabilis* (30 %) and the remaining 10 % as *Enterobacter cloacae*. A concordance ratio was found between the FASTinov[®] gramneg kit and the routine methods of 95.0% for the EUCAST protocol (protocol used in Portugal labs).

With this work, it was possible to create a rapid diagnostic method (about 2 hours) by combining urine sample screening by Sysmex UF-1000i, identification of the

microorganism by MALDI-TOF and determination of antimicrobial susceptibility by flow cytometry using the kit FASTinov[®] gramneg, enabling targeted treatment. However, further studies should be performed to prove the results obtained.

Key words: diagnosis of urinary tract infections, Gram-negative bacilli, MALDI-TOF, flow cytometry, antimicrobial susceptibility tests

Índice geral

1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento teórico acerca de infeções do trato urinário.....	1
1.2. Epidemiologia.....	2
1.3. Etiologia.....	3
1.4. Diagnóstico laboratorial.....	5
1.4.1. Identificação dos microrganismos.....	7
1.4.2. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos.....	8
1.5. Citometria de fluxo aplicada à Microbiologia.....	11
1.5.1. Sysmex UF-1000i.....	11
1.5.2. BD Accuri™ C6 Plus.....	13
2. Objetivos.....	14
3. Materiais e métodos.....	15
3.1. Validação do <i>kit</i> FASTinov® gramneg para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos.....	15
3.1.1. Amostras de urina inoculadas com estirpes bacterianas de controlo.....	15
3.1.2. Caracterização do <i>kit</i> FASTinov® gramneg.....	15
3.1.3. Inoculação do <i>kit</i> FASTinov® gramneg.....	16
3.1.4. Ensaio de reprodutibilidade do método citométrico.....	17
3.1.5. Avaliação da suscetibilidade pelo método de referência.....	17
3.2. Seleção e preparação das amostras clínicas de urina.....	18
3.2.1. Amostras de urina.....	18
3.2.2. Análise e avaliação das amostras de urina pelo citómetro de fluxo Sysmex UF-1000i.....	19
3.2.3. Otimização do protocolo para extração dos microrganismos a partir da urina e avaliação da sua eficácia.....	19
3.3. Identificação bacteriana por espectrometria de massa diretamente a partir da amostra de urina purificada.....	20

3.4. Prova de conceito em amostras clínicas urinárias.....	20
3.4.1. Amostras clínicas de urina positivas para bacilos Gram-negativo.....	20
3.4.2. Processamento das amostras para identificação direta no MALDI-TOF e análise da suscetibilidade por citometria de fluxo.....	20
3.4.3. Processamento das amostras pelo método de rotina	20
3.5. Análise estatística	21
4. Resultados	23
4.1. Validação do <i>kit</i> FASTinov [®] gramneg.....	23
4.1.1. Caracterização das estirpes bacterianas ATCC.....	23
4.1.2. Validação do <i>kit</i> FASTinov [®] gramneg com urinas inoculadas	25
4.1.3. Reprodutibilidade do <i>kit</i> FASTinov [®] gramneg	30
4.2. <i>Screening</i> pelo citómetro Sysmex UF-1000i	30
4.3. Identificação das amostras positivas pelo MALDI-TOF	33
4.4. Prova de conceito em amostras urinárias de doentes.....	33
5. Discussão dos resultados e Conclusão	37
6. Perspetivas futuras.....	40
7. Bibliografia.....	41

Lista de abreviaturas

BH	Meio líquido <i>Brain-Heart Infusion</i>
BHA	Meio <i>Brain-Heart Infusion Agar</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESBL	β -lactamases de largo espectro
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
GBS	<i>Streptococcus</i> do grupo B
h	Horas
I	Intermediário
ITU	Infeção do trato urinário
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MALDI-TOF <i>Time of Flight</i>	Espectrometria de massa <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-</i> <i>Time of Flight</i>
MH Ca²⁺	Meio líquido <i>Mueller Hinton Broth 2 Cation-Adjusted</i>
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
mm	Milímetros
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanómetros
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
R	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
S	Suscetível
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica

Índice de tabelas

Tabela I: Fármacos usados no <i>kit</i> FASTinov® gramneg para <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Pseudomonas</i> spp.	16
Tabela II: Fármacos usados na avaliação da suscetibilidade pelo método de referência e as concentrações testadas pelos protocolos EUCAST e CLSI (CLSI, 2017; EUCAST, 2018)	18
Tabela III: Resultados dos fenótipos obtidos no método de referência, microdiluição em caldo para as estirpes bacterianas ATCC para os protocolos EUCAST e CLSI.....	24
Tabela IV: Resultados dos fenótipos obtidos no ϵ -test para as estirpes bacterianas ATCC para os protocolos EUCAST e CLSI.....	25
Tabela V: Taxa de erros do <i>kit</i> FASTinov® gramneg e a proporção de concordância com o método de referência para o protocolo EUCAST relativamente às urinas inoculadas com as estirpes bacterianas ATCC	28
Tabela VI: Taxa de erros do <i>kit</i> FASTinov® gramneg e a proporção de concordância com o método de referência para o protocolo CLSI relativamente às urinas inoculadas com as estirpes bacterianas ATCC	29
Tabela VII: Estudo da reprodutibilidade feita em dois dias distintos para as 6 estirpes ATCC estudadas.....	30
Tabela VIII: Resultados dos fenótipos obtidos pelo <i>Vitek 2</i> para as amostras de urina de doentes.....	35
Tabela IX: Resultados dos fenótipos obtidos na microdiluição em caldo para o fármaco colistina e no ϵ -test para o ceftolozane/tazobactam para as amostras de urina de doentes .	35
Tabela X: Taxa de erros do <i>kit</i> FASTinov® gramneg e a proporção de concordância com o método de rotina, <i>Vitek 2</i> para o protocolo EUCAST	36

Índice de figuras

Figura I: Etiologia das infecções urinárias complicadas e não complicadas. UPEC – <i>E. coli</i> uropatogénica; GBS – <i>Streptococcus</i> do grupo B (Flores-Mireles, Walker, Caparon, & Hultgren, 2015).....	4
Figura II: Sysmex UF-1000i. (Sysmex America, 2009).....	12
Figura III: BD Accuri™ C6 Plus com o BD CSampler™ Plus. (Biosciences, 2018).....	13
Figura IV: Histogramas representativos da distribuição de fluorescência apresentada para a estirpe de controlo de qualidade <i>K. pneumoniae</i> BAA 1705 após incubação de 1 h no <i>kit</i> FASTinov® gramneg. A. Avaliação da suscetibilidade aos fármacos em estudo e respetiva interpretação fenotípica. B. Deteção da presença de ESBL tipo I. Controlo – Células viáveis (não tratadas) marcadas com o respetivo marcador de fluorescência; C1, C2, C3 e C4 - concentrações seriadas de cada antimicrobiano em µg/mL.....	26
Figura V: Histogramas representativos da distribuição de fluorescência apresentada para a estirpe de controlo de qualidade <i>E. coli</i> ATCC 35218 após incubação de 1 h no <i>kit</i> FASTinov® gramneg. A. Avaliação da suscetibilidade aos fármacos em estudo e respetiva interpretação fenotípica. B. Deteção da presença de ESBL tipo I. Controlo – Células viáveis (não tratadas) marcadas com o respetivo marcador de fluorescência; C1, C2, C3 e C4 concentrações seriadas de cada antimicrobiano em µg/mL.....	27
Figura VI: Exemplo de um resultado do Sysmex UF-1000i para uma amostra clínica de urina com bacilos Gram-negativo com uma contagem de $2,7 \times 10^8$ bactérias/mL evidenciado com retângulos vermelhos.....	31
Figura VII: Exemplo de um resultado do Sysmex UF-1000i para uma amostra clínica de urina com ‘cocos/mistura’ com uma contagem de $8,6 \times 10^7$ bactérias/mL evidenciado com retângulos vermelhos.....	32
Figura VIII: Distribuição dos isolados identificados pelo MALDI-TOF.....	33
Figura IX: Distribuição dos isolados das amostras de urina de doentes identificados pelo MALDI-TOF.....	34

1. Introdução

1.1. Enquadramento teórico acerca de infeções do trato urinário

A infeção do trato urinário (ITU) é das infeções mais frequentes no ser humano e constitui um grave problema de saúde pública, afetando indivíduos de qualquer idade, sendo mais prevalente nas mulheres (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Foxman, 2014; Masajtis-Zagajewska & Nowicki, 2017).

Nos Estados Unidos da América (EUA), estas infeções são responsáveis por cerca de 7 milhões de consultas médicas, 1 milhão de consultas no departamento de emergência, resultando em 100 mil hospitalizações por ano (Kumar, Dave, Wolf, & Lerma, 2015).

Os microrganismos mais prevalentes destas infeções são os bacilos Gram-negativo, sendo muitas vezes resistentes aos principais agentes antimicrobianos. O diagnóstico microbiológico é essencial mas demorado, uma vez que só se obtêm os resultados após 48 horas da colheita da amostra biológica (Davenport *et al.*, 2017). Para além disso, a taxa de ITU recorrentes é elevada e o uso incorreto ou excessivo de antibióticos leva a um aumento do número de bactérias resistentes, envolvendo custos elevados para a sociedade (Davenport *et al.*, 2017; Flores-Mireles *et al.*, 2015). Consequentemente, novos testes e tecnologias são necessários para diminuir o tempo de obtenção de resultados e otimizar o tratamento (Davenport *et al.*, 2017).

A ITU é das infeções mais comuns tanto em ambiente hospitalar como na comunidade e pode ser definida como uma invasão e multiplicação de microrganismos nos tecidos do trato urinário desde a uretra até aos rins, incluindo, no sexo masculino, a próstata e o epidídimo (Foxman, 2010, 2014; Mendo *et al.*, 2009). Estas infeções são principalmente de origem bacteriana, embora, infeções de origem vírica, fúngica e parasítica possam também ocorrer (Sheerin, 2015).

A colonização bacteriana assintomática é muito comum nas mulheres e nos idosos (Sheerin, 2015). Esta colonização é designada de bacteriúria assintomática quando as bactérias presentes na urina podem ser isoladas com contagens significativas (superiores a 10^5 bactérias/mL) na ausência de sintomas característicos da ITU (Sheerin, 2015; Walsh & Collins, 2017). A bacteriúria assintomática pode aumentar o risco de desenvolvimento de uma ITU sintomática (Sheerin, 2015).

De um ponto de vista clínico, as ITU podem ser classificadas em não complicadas ou complicadas. As ITU não complicadas são o tipo de infeção mais comum e geralmente afetam indivíduos saudáveis e que não apresentam anormalidades estruturais ou funcionais do trato urinário (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Sheerin, 2015). Por outro lado, as ITU complicadas podem ser definidas como infeções sintomáticas da bexiga ou rins que ocorrem na presença de anormalidade estrutural ou funcional do aparelho urinário. Estas impedem o fluxo normal da urina e estão associadas a fatores que comprometem a defesa do hospedeiro ou do trato urinário, incluindo obstrução e retenção urinária causada por doença neurológica, imunossupressão, insuficiência renal, transplante renal, gravidez, diabetes e presença de corpos estranhos como cateteres ou outros dispositivos de drenagem (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Sheerin, 2015; Walsh & Collyns, 2017).

De acordo com o local de infeção, as ITU apresentam designações diferentes, nomeadamente, cistite, ITU inferior que envolve a bexiga e pielonefrite, ITU superior localizada acima da bexiga, envolvendo os rins (Flores-Mireles *et al.*, 2015; José Barbas Rodrigues & Paula Dias Barroso, 2011). A cistite é a ITU mais comum, mas a infeção pode disseminar-se por todo o trato urinário, causando inflamação e infeção dos rins (pielonefrite), da uretra (uretrite) e nas glândulas acessórias masculinas (prostatite), sendo a forma mais grave de ITU, a urosépsis pondo em risco a vida do paciente (Sheerin, 2015; Walsh & Collyns, 2017).

1.2. Epidemiologia

A ITU é a segunda infeção mais comum nos seres humanos sendo apenas ultrapassada pelas infeções do trato respiratório. Para além disso, as ITU são as infeções bacterianas que afetam cerca de 150 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma das principais razões para os doentes procurarem cuidados médicos (Flores-Mireles *et al.*, 2015; José Barbas Rodrigues & Paula Dias Barroso, 2011; Masajtis-Zagajewska & Nowicki, 2017; Rolo, Parada, & Moreira, 2008).

Em Portugal, os estudos epidemiológicos são escassos, sendo necessário recorrer a informações de outros países. Nos EUA, as ITU são responsáveis por cerca de 100 mil hospitalizações por ano e estão associados à presença de 15% dos antibióticos na comunidade, sendo a sua maioria tratadas empiricamente sem recorrerem a análises da urina

(Foxman, 2010; Kumar *et al.*, 2015; Mazzariol, Bazaj, & Cornaglia, 2017; Mendo *et al.*, 2009).

As ITU ocorrem em todas as idades, verificando-se, nos primeiros meses de vida, uma maior incidência no sexo masculino, devido a um maior número de malformações congénitas. A partir deste período, durante toda a infância e principalmente na fase escolar/adolescência, a suscetibilidade para este tipo de infecção aumenta nas raparigas. Nas mulheres adultas, a incidência da ITU é mais elevada devido à atividade sexual, gravidez e menopausa. Uma outra razão para esta prevalência é o curto comprimento da uretra assim como a proximidade da uretra com o ânus e a vagina (Foxman, 2010; Lee & Neild, 2007; Mendo *et al.*, 2009).

Sabe-se que cerca de metade das mulheres poderá desenvolver pelo menos uma ITU durante a sua vida e uma em cada quatro dessas mulheres poderá ter uma recorrência (Foxman, 2002; Walsh & Collyns, 2017). Uma ITU recorrente é definida como a ocorrência de 2 ou mais ITU não complicadas em 6 meses ou pelo menos 3 episódios em 12 meses (Glover, Moreira, Sperandio, & Zimmern, 2014; Suskind *et al.*, 2016).

Num contexto hospitalar, as ITU são as infeções mais comuns, sendo a grande maioria associada à presença de cateteres (Sheerin, 2015).

1.3. Etiologia

As ITU são infeções maioritariamente bacterianas causadas principalmente por bacilos Gram-negativo (Bader, Loeb, & Brooks, 2017; Mazzariol *et al.*, 2017; Sheerin, 2015).

Em condições normais, o trato urinário é estéril e a infeção desenvolve-se quando a bactéria o consegue atingir ultrapassando os mecanismos de defesa do hospedeiro (Sheerin, 2015). Sendo assim, a colonização do aparelho urinário pode fazer-se por 3 vias: a via ascendente, a hematogénea e a linfática. As infeções pela via ascendente são responsáveis pela maioria dos casos de cistite e pielonefrite não complicadas. Nesta via, as bactérias provenientes da flora fecal e uretral entram na uretra, ascendem até à bexiga e posteriormente até aos rins. A via hematogénea é menos comum e os microrganismos contaminam o sangue e só depois é que infetam o trato urinário (Correia *et al.*, 2007; Lee & Neild, 2007; Walsh &

Collins, 2017). Por último, a via linfática é considerada uma via discutível de disseminação da infecção urinária que poderá atingir um nível crónico (Correia *et al.*, 2007).

A *Escherichia coli* é o principal agente causador de ITU complicadas e não complicadas. Bactérias da família das *Enterobacteriaceae* estão presentes no trato gastrointestinal humano, no entanto, apenas algumas estirpes de *E. coli* são capazes de infectar eficazmente o trato urinário sendo designadas de *E. coli* uropatogénicas (UPEC) (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Walsh & Collins, 2017).

Para além de *E. coli*, outros bacilos Gram-negativo podem causar ITU como é o caso de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e ainda cocos Gram-positivo nomeadamente o *Enterococcus faecalis* e o *Staphylococcus saprophyticus* (Figura I).

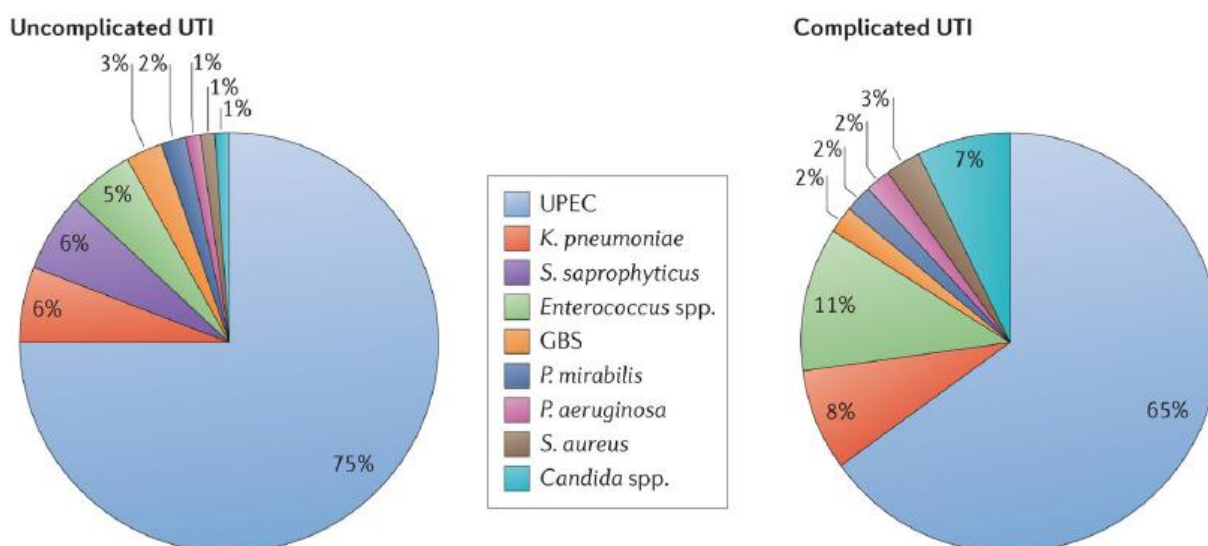


Figura I: Etiologia das infeções urinárias complicadas e não complicadas. UPEC – *E. coli* uropatogénica; GBS – *Streptococcus* do grupo B (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

De acordo com a Figura I, nas ITU não complicadas, a UPEC é o agente etiológico mais frequente com 75% das infeções seguido pela *K. pneumoniae* e *S. saprophyticus* e em percentagens menores o *E. faecalis*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. Por outro lado, nas ITU complicadas verifica-se uma percentagem ligeiramente significativa de bactérias que não a *E. coli*, nas quais se destacam *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e ainda espécies de fungo *Candida* (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Infelizmente, as ITU estão a tornar-se cada vez mais difíceis de tratar devido ao aumento da resistência aos antibióticos (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Esta resistência microbiana está associada ao uso inadequado de antibióticos no tratamento empírico, o que pode levar à falha no tratamento, redução das opções de tratamento, desenvolvimento de bacteremia, tempo prolongado de internamento hospitalar e a um aumento dos custos (Bader *et al.*, 2017; Davenport *et al.*, 2017).

1.4. Diagnóstico laboratorial

De um modo geral, o diagnóstico laboratorial das ITU consiste na análise de uma amostra de urina incluindo: análise bioquímica (tiras-teste Combur), a análise citológica (citometria e/ou microscopia) e o exame bacteriológico (exame cultural de urina) (Chu & Lowder, 2018).

Para o início deste processo, é necessário a colheita do produto biológico, neste caso, a urina, normalmente por micção assética. Sendo assim, em mulheres e homens autónomos, deve ser realizada uma lavagem dos órgãos genitais, sendo a primeira porção do jato urinário rejeitado e a porção média colhida para um contentor estéril. Nas crianças até aos 2-3 anos, recorre-se frequentemente a um saco coletor esterilizado, que é adaptado à pele, junto aos órgãos genitais, depois da lavagem e desinfeção destes. Após a micção da criança, a urina do saco coletor é transferida para um recipiente estéril. No caso dos doentes algaliados, deve colher-se diretamente do tubo que sai da uretra e nunca do saco coletor. Em casos especiais, pode recorrer-se à punção supra púbica (José Barbas Rodrigues & Paula Dias Barroso, 2011).

A análise bioquímica permite a análise de múltiplos componentes da urina nomeadamente detetar a presença da enzima esterase leucocitária, nitritos e eritrócitos. A esterase leucocitária é produzida pelos leucócitos e encontra-se em níveis elevados na urina durante a infeção. Os nitritos são indicativos da presença de bactérias, visto que algumas bactérias uropatogénicas possuem enzimas capazes de converter nitratos em nitritos. Para além disso, as tiras-teste conseguem detetar baixos níveis de eritrócitos na urina. Contudo, o sangue pode estar associado a outras patologias, mas na presença de sintomas da ITU ou na presença de nitritos e esterase leucocitária, a probabilidade de ser uma ITU aumenta. Algumas vantagens deste teste são a sua simplicidade no uso e a sua interpretação ser feita em alguns minutos. Por outro lado, algumas condições podem influenciar a interpretação

dos resultados como é o caso de algumas bactérias (*Enterococcus* spp. e *S. saprophyticus*) não reduzirem os nitratos a nitritos, resultando em falsos negativos. Para evitar isso, os resultados devem ser interpretados em função da clínica e nas características do doente (Chu & Lowder, 2018).

A análise citológica permite avaliar a morfologia das células epiteliais, a presença de leucócitos e eritrócitos, bem como de cristais, cilindros e muco e pode ocasionalmente ser útil para confirmar ou excluir a ITU. Esta análise pode ser efetuada citometria de fluxo e/ou microscopia (Chu & Lowder, 2018; José Barbas Rodrigues & Paula Dias Barroso, 2011).

Por fim, a urocultura ou cultura de urina é o método padrão para o diagnóstico da ITU sendo considerado o teste de diagnóstico mais adequado para bacteriúria assintomática na gravidez (Chu & Lowder, 2018). Para além das mulheres grávidas e de acordo com a norma nº 015/2011 da Direção-Geral da Saúde (DGS), a urocultura é recomendada no homem, na idade pediátrica, na pielonefrite e nas infeções complicadas ou recidivantes da mulher adulta (DGS, 2011). A urocultura consiste na sementeira da urina com o intuito de pesquisar a existência de bactérias e/ou fungos. Considera-se a urocultura positiva quando o número de bactérias é igual ou superior 10^5 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colónias por mililitro) na presença de um único agente etiológico em duas amostras consecutivas nas mulheres e numa amostra nos homens mesmo sem sintomas. No entanto, em certos casos pode-se valorizar contagens inferiores a 10^4 UFC/mL em pacientes com sintomas de ITU, doentes cateterizados, insuficientes renais, imunodeprimidos e doentes a fazer tratamento antimicrobiano (Bonkat *et al.*, 2018; de Souza & Olsburgh, 2008; Imam, 2018; Smelov, Naber, & Bjerklund Johansen, 2016).

Na presença de uma urocultura positiva, procede-se à identificação da bactéria e à realização do respetivo antibiograma. Se a cultura apresentar três ou mais estirpes diferentes é considerada contaminação e recomenda-se uma nova colheita de urina. Caso sejam identificadas duas estirpes no mesmo meio de cultura, o resultado terá de ser integrado na situação clínica do paciente, podendo ser ou não valorizado (José Barbas Rodrigues & Paula Dias Barroso, 2011; Mendo *et al.*, 2009).

O exame cultural da urina apesar de simples e barato demora um mínimo de 48 horas para obtenção de resultados, identificação e determinação da suscetibilidade aos antibióticos

mesmo com os métodos automáticos existentes neste momento nos laboratórios de rotina (Davenport *et al.*, 2017; Monsen & Ryden, 2017).

1.4.1. Identificação dos microrganismos

Na rotina, a identificação das bactérias é efetuada a partir de colónias isoladas por métodos bioquímicos, isto é estudos do comportamento dos microrganismos perante diferentes substratos. Estas provas são efetuadas na maioria dos laboratórios utilizando equipamentos automáticos como o *Vitek 2* (BioMérieux), *BD Phoenix Automated Microbiology System* (Becton Dickinson Diagnostics) ou *MicroScan WalkAway* (Siemens) em paralelo aos testes de suscetibilidade (ver ponto 1.4.2). São assim métodos demorados que podem variar consoante o microrganismo de 4 a 16 horas (Jorgensen & Ferraro, 2009).

Atualmente, a espectrometria de massa *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) é cada vez mais utilizada no diagnóstico microbiológico tendo já substituído métodos convencionais de diferenciação bioquímica em alguns laboratórios. Trata-se de uma técnica analítica na qual moléculas carregadas são criadas por ionização e a sua identificação é determinada com base na relação massa/carga. O MALDI-TOF é uma técnica sensível que tem sido usada na análise de biomoléculas como na identificação de marcadores bioquímicos específicos no diagnóstico de tumores, artrite reumatoide, Alzheimer e alergias bem como a sua utilização na identificação de patogénios (Davenport *et al.*, 2017; Wieser, Schneider, Jung, & Schubert, 2012).

Este método é rápido onde se pode obter os resultados dentro de minutos em comparação com os métodos convencionais, o que pode ser crítico em diagnósticos clínicos. A maioria das vezes esta identificação é efetuada a partir de colónias isoladas poupando ainda assim muitas horas. Alguns equipamentos, nomeadamente o da Bruker já está validado para fazer a identificação diretamente a partir de hemoculturas poupando neste caso cerca de 2 dias.

Alguns autores relataram já a identificação de microrganismos por MALDI-TOF em amostras de urina com ITU como sendo um método rápido e preciso na identificação das bactérias (Oviano, Ramirez, Barbeyto, & Bou, 2017; X. H. Wang *et al.*, 2013; Zboromyrska *et al.*, 2016).

No entanto, existem algumas limitações associadas ao MALDI-TOF como o custo inicial elevado na compra do equipamento bem como na preparação da amostra (Davenport *et al.*, 2017; Wieser *et al.*, 2012).

1.4.2. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos

Uma das principais tarefas realizadas nos Laboratórios de Microbiologia são os testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA), em isolados clínicos que têm como objetivos avaliar a suscetibilidade aos fármacos escolhidos para infecções específicas e detetar possíveis resistências aos antibióticos nos isolados bacterianos de forma a orientar a terapêutica (Jorgensen & Ferraro, 2009).

Os TSA são habitualmente realizados paralelamente à identificação e são ensaios tipicamente fenotípicos que determinam a capacidade replicativa de um determinado microrganismo na presença de agentes antimicrobianos específicos. Estes testes podem ser realizados segundo o protocolo europeu *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) ou segundo o protocolo americano *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2015, 2017; Davenport *et al.*, 2017; EUCAST, 2018).

Alguns métodos permitem a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) em µg/mL do antibiótico em relação ao patógeno testado, outros são só qualitativos. A CMI é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de suscetibilidade *in vitro* (Arena, Viaggi, Galli, & Rossolini, 2015; CLSI, 2015).

Sendo assim, os resultados dos TSA são interpretados de acordo com os protocolos EUCAST e CLSI nas seguintes categorias: suscetível (S), intermédio (I) ou resistente (R). Um resultado S significa que o microrganismo deverá responder à terapia com determinado antibiótico usando a dosagem recomendada para o tipo de infeção. Por outro lado, um organismo que seja R a determinado fármaco não é inibido pelas concentrações prescritas do mesmo. Por fim, um resultado I indica que os organismos apresentam CMI de agentes antimicrobianos que atingem concentrações sanguíneas e tecidulares aceitáveis, para os quais a taxa de resposta pode ser mais baixa que nos isolados suscetíveis. Ou seja, este resultado implica que há eficácia clínica nos locais onde os agentes estão fisiologicamente

concentrados (como as quinolonas e β -lactâmicos na urina) ou quando é usada uma dose mais elevada que a normalmente prescrita (como os β -lactâmicos). A informação acerca da categoria fenotípica e das CMI podem ajudar o médico a selecionar uma terapia mais adequada (CLSI, 2015; Jorgensen & Ferraro, 2009).

A avaliação da suscetibilidade antimicrobiana pode ser feita por métodos manuais como os métodos de diluição, difusão em disco e difusão em gradiente ou por métodos automáticos que serão detalhados em seguida (Jorgensen & Ferraro, 2009).

O método de diluição é o método de referência e pode ser efetuado por duas técnicas: pela macrodiluição efetuada em tubos de ensaio ou pela microdiluição realizada em placas de 96 poços. Ambas as técnicas envolvem a preparação de diluições seriadas de antibióticos, a inoculação de uma suspensão bacteriana padrão de 1 a 5×10^5 UFC/mL e a incubação *overnight* a 35°C. Após a incubação é observado o crescimento bacteriano e determina-se a CMI. Atualmente, a microdiluição é considerada o método padrão, uma vez que é possível testar vários antibióticos com as suas diluições seriadas na mesma placa, há economia de reagente e espaço em relação à macrodiluição (Jorgensen & Ferraro, 2009).

O método de difusão em disco é um teste simples e prático que se baseia na inoculação da bactéria com aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL na superfície de uma placa com o meio *Mueller-Hinton Agar* onde posteriormente se adicionam os discos impregnados com uma concentração fixa de um determinado fármaco que vai a incubar a 35°C entre 16 a 24 h. Depois da incubação, determina-se, em mm, o diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano em torno do disco com o antibiótico. Este diâmetro da zona de inibição está relacionado com a suscetibilidade do isolado e com a taxa de difusão do fármaco através do meio (Jorgensen & Ferraro, 2009).

Por fim, o método de difusão em gradiente ou mais conhecido pela versão comercial ϵ -test (*Epsilon test*) utiliza o princípio do estabelecimento de um gradiente de concentração antimicrobiana num meio sólido a fim de determinar a suscetibilidade sob a forma de CMI. O ϵ -test corresponde a uma tira de plástico impregnada com um gradiente de concentração de antibiótico seco na parte inferior e uma escala de concentrações na parte superior que é colocada numa placa com meio sólido, previamente inoculada com a suspensão bacteriana padrão. Após a incubação *overnight*, os resultados são observados e a CMI é determinada pela interseção da parte inferior da área de inibição do crescimento com a tira de plástico.

Os resultados das CMI são depois interpretados pelas categorias fenotípicas (Jorgensen & Ferraro, 2009).

Os métodos automáticos usados na rotina vieram facilitar a obtenção dos resultados de TSA em curtos períodos de tempo em comparação com os métodos manuais devido aos sistemas de detecção ótica sensíveis que permitem a detecção de pequenas mudanças no crescimento bacteriano.

O *MicroScan WalkAway* (Siemens) é um equipamento de leitura e de incubação que permite identificar e realizar o TSA podendo analisar e incubar 40 ou 96 painéis de microdiluição. Estes são hidratados e inoculados manualmente e em seguida incubados no equipamento. Durante a incubação, o desenvolvimento de crescimento microbiano é determinado pela análise periódica com um fotômetro ou fluorômetro do equipamento. Os painéis de teste de suscetibilidade para bacilos Gram-negativo contendo substratos fluorogênicos são lidos entre 3,5 a 7 h.

O *BD Phoenix Automated Microbiology System* (Becton Dickinson Diagnostics) é um sistema incubador capaz de processar 99 painéis de teste com 84 poços para as diluições seriadas de antibióticos inoculadas manualmente. Este equipamento analisa cada painel usando a detecção do crescimento turbidométrico e colorimétrico (indicador de redução de oxidação). Os resultados das CMI são obtidos entre 6 a 16 h.

O Sistema *Vitek 2* (BioMérieux) é um equipamento bastante automatizado que usa umas cartas de plástico de 64 poços que contêm antibióticos e meios de cultura. Este aparelho pode acomodar cerca de 30 a 240 cartas, faz a análise do crescimento bacteriano por turbidimetria e os resultados são obtidos ao fim de 4 a 10 h.

Por último, o *Sensititre ARIS 2X* (Trek Diagnostic Systems) é também um sistema de incubação e leitura automatizado capaz de processar 64 painéis (placas de microdiluição padrão de 96 poços que podem ser inoculadas pelo próprio equipamento). Este sistema monitoriza o crescimento pela medição de fluorescência após 18 a 24 h de incubação.

Dos 4 equipamentos apresentados, 3 deles produzem resultados de TSA entre 3,5 a 16 h enquanto o último é um sistema *overnight*. Para além disso, todos os equipamentos possuem *softwares* de computador usados para interpretar os resultados de suscetibilidade,

incluindo sistemas especiais para analisar os resultados de testes para padrões atípicos e fenótipos de resistência incomuns (Jorgensen & Ferraro, 2009).

1.5. Citometria de fluxo aplicada à Microbiologia

A citometria de fluxo é uma técnica que tem a capacidade de medir e analisar as características morfológicas e de fluorescência de uma única célula, como microrganismos, num fluxo contínuo quando passam por uma fonte de luz, normalmente luz laser. O tamanho, a complexidade e a intensidade de fluorescência podem ser assim quantificadas num grande número de células em poucos segundos (Adan, Alizada, Kiraz, Baran, & Nalbant, 2017).

Esta técnica é uma ferramenta útil e rápida e tem sido usada em várias áreas como na análise da proliferação celular e ciclo celular, deteção de células, componentes celulares (organelos, DNA, RNA, citocinas, proteínas, hormonas), antigénios nucleares e citoplasmáticos entre outras (Adan *et al.*, 2017).

Na microbiologia, a citometria de fluxo tem vindo a ser explorada e usada com grandes vantagens devido ao elevado potencial para melhorar o diagnóstico clínico. Uma particularidade da citometria de fluxo é a sua capacidade de análise multi-paramétrica, e funcional. As suas aplicações vão desde a identificação de microrganismos usando anticorpos monoclonais para alvos específicos de antigénios, estudos dos mecanismos de ação dos fármacos (como a lesão da membrana citoplasmática, bloqueio de bombas de efluxo, diminuição da absorção do fármaco), de mecanismos de resistência, de monitorização do antimicrobiano e efeito pós-antibiótico, de adesão em leveduras até à avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos de forma rápida (Pina-Vaz *et al.*, 2017).

O grupo de investigação da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto desenvolveu um *kit* de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo (Pina-Vaz *et al.*, 2017).

1.5.1. Sysmex UF-1000i

O Sysmex UF-1000i (figura II, Sysmex Co.) é um citómetro de fluxo totalmente automatizado que tem a capacidade de classificar e contar células e partículas como bactérias e leveduras assim como leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cristais, cilindros, espermatozoides, pequenas células redondas e muco em amostras de urina (De Rosa *et al.*, 2010).

Este citômetro difere da geração anterior de citômetros de fluxo de urina (UF-100) por usar um laser semiconductor de 635 nm e dois canais analíticos onde cada um contém corantes fluorescentes, temperatura e tempo de incubação específicos, sendo um deles usado para a análise das bactérias e outro para a análise dos outros componentes da urina (De Rosa *et al.*, 2010; J. Wang, Zhang, Xu, Shao, & Lu, 2010).

A existência de um canal especial para a análise das bactérias permite uma detecção muito sensível das bactérias até níveis de concentração entre os 10^2 a 10^3 bactérias/mL e ainda possibilita que a interferência com os eritrócitos seja evitada. Para além disso, o Sysmex pode analisar teoricamente até 100 amostras por hora, exigindo um volume de 4,0 mL de amostra de urina não centrifugada no modo automático (onde a amostra é automaticamente misturada) ou 1,0 mL no modo manual (De Rosa *et al.*, 2010; Manoni *et al.*, 2009; Mejuto, Luengo, & Diaz-Gigante, 2017; J. Wang *et al.*, 2010).

A utilização deste equipamento no *screening* de urinas negativas, dispensando a sua cultura está em fase de implementação em alguns laboratórios clínicos. O Sysmex UF-1000i fornece 2 tipos de informação acerca da amostra de urina: a contagem de bactérias e a morfologia destas em bacilos ou ‘cocos/mistura’ (Geerts *et al.*, 2015).



Figura II: Sysmex UF-1000i. (Sysmex America, 2009).

1.5.2. BD Accuri™ C6 Plus

O BD Accuri™ C6 Plus (figura III, BD Biosciences) é um citômetro de fluxo fácil de usar, constituído por 2 lasers (de 488 e 640 nm), 2 detetores de luz (de dispersão frontal e lateral) e 4 detetores de fluorescência com filtros óticos otimizados, analisando desta forma, 6 parâmetros. Para maior comodidade, este equipamento disponibiliza um acessório opcional, o BD CSampler™ Plus que permite analisar um suporte de 24 tubos e placas de 48 e 96 poços. Para além disso, este possui um sistema exclusivo de fluídos que acionado por bombas peristálticas permite determinar o volume da amostra e conta as células de forma rápida, direta e automática no *software*, eliminando as contagens demoradas de placas (Biosciences, 2018; Picot, Guerin, Le Van Kim, & Boulanger, 2012).



Figura III: BD Accuri™ C6 Plus com o BD CSampler™ Plus. (Biosciences, 2018).

2. Objetivos

Este projeto tem como principal objetivo desenvolver um método rápido de avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos diretamente da urina infetada de modo a permitir a instituição da terapêutica adequada à situação clínica. Para selecionar as amostras representativas de um quadro infeccioso, pretendeu-se avaliar a acuidade do citómetro de fluxo Sysmex UF-1000i para o *screening* de amostras positivas de urina para bacilos Gram-negativo. Como a interpretação da suscetibilidade é dependente da identificação, a espetrometria de massa, MALDI-TOF, foi realizada diretamente a partir da amostra. O perfil de suscetibilidade antimicrobiano por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras positivas para bacilos Gram-negativo foi determinado e comparado com o método de referência e o método de rotina do laboratório.

3. Materiais e métodos

3.1. Validação do *kit* FASTinov® gramneg para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

3.1.1. Amostras de urina inoculadas com estirpes bacterianas de controlo

Neste trabalho, procedeu-se à inoculação de urina humana de dadores saudáveis após filtração (filtro de acetato de celulose 0,45 µm, Frilabo) de acordo com Roos V. *et al.*, (2006)(Roos, Ulett, Schembri, & Klemm, 2006).

Para este objetivo foram utilizadas 13 estirpes bacterianas de controlo de qualidade pertencentes à *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 35218, NCTC 13846 MCR-1, ATCC 8739, IMP NCTC 13476, *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705, BAA 1706, ATCC 700603, OXA-48, NCTC 13443 NDM-1, *Enterobacter cloacae* CCUG 59627, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, IMP-8 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Estes isolados encontram-se armazenados a -80°C em meio líquido *Brain-Heart Infusion* (BH, Liofilchem, Itália) suplementado com 20% de glicerol (Frilabo, Portugal). Antes de cada experiência, as estirpes foram semeadas em *Brain-Heart Infusion Agar* (BHA, Liofilchem) de forma a garantir a sua pureza e viabilidade.

Cada estirpe de controlo foi inoculada em 5 mL de meio líquido *Mueller Hinton Broth 2 Cation-Adjusted* (MH Ca²⁺, Sigma-Aldrich, EUA), e incubada *overnight* a 37°C com agitação, 130 rpm. No dia seguinte, cerca de 20 mL de urina filtrada foram inoculados com a suspensão celular de forma a obter uma densidade ótima (DO_{600nm}) de 0,05 e incubados a 37°C com agitação, 130 rpm (Roos *et al.*, 2006), durante 120-180 min até atingir a fase exponencial.

3.1.2. Caracterização do *kit* FASTinov® gramneg

A tecnologia da FASTinov® encontra-se patenteada WO 2012164547 A1 e tem por princípio a avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos por citometria de fluxo. O *kit* FASTinov® gramneg é uma microplaca de 96 poços que inclui várias concentrações dos fármacos listados na tabela I e diferentes fluorocromos (nomeadamente marcadores de potencial e permeabilidade da membrana) previamente otimizados.

Consoante a identificação do microrganismo, o *software* desenvolvido pela FASTinov forneceu os resultados acerca da suscetibilidade (fenótipo Suscetível (S), Intermédio (I) ou Resistente (R)). Adicionalmente o *kit* deteta a presença de enzimas β -lactamases de largo espectro (ESBL) para *Enterobacteriaceae* grupo I (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis*).

Tabela I: Fármacos usados no *kit* FASTinov[®] gramneg para *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp.

Fármacos	<i>kit</i> FASTinov [®] gramneg	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
Amicacina	X	X
Ampicilina	X	
Amoxicilina/Ác. Clavulânico	X	
Ceftazidima	X	X
Ciprofloxacina	X	X
Gentamicina	X	X
Colistina	X	X
Ceftolozane/Tazobactam	X	X
Cefotaxima	X	
Imipenemo	X	X
Meropenemo	X	X
Piperacilina/Tazobactam	X	X

3.1.3. Inoculação do *kit* FASTinov[®] gramneg

Cada amostra de urina inoculada com determinado microrganismo, quando em fase exponencial (após incubação cerca de 120-180 min) foi centrifugada a 13000 rpm, durante 1 min duas vezes e ressuspendida em 200 μ L de meio MH Ca²⁺ (Sigma-Aldrich) e ajustada a 0,5 McFarland em meio MH Ca²⁺ (Sigma-Aldrich). Esta suspensão foi diluída 1:10 e inoculado o *kit* FASTinov[®] gramneg. Após inoculação, o *kit* FASTinov[®] gramneg foi incubado durante 1 h a 37°C, com agitação e, posteriormente, foi analisado no citómetro de fluxo BD Accuri[™] C6 Plus (BD Biosciences, EUA). Os resultados citométricos foram analisados de acordo com os protocolos EUCAST e CLSI pelo *software* desenvolvido pela FASTinov.

3.1.4. Ensaio de reprodutibilidade do método citométrico

Para o estudo da reprodutibilidade do *kit* FASTinov® gramneg para a avaliação da suscetibilidade por citometria de fluxo, o ensaio descrito no ponto anterior foi realizado em duplicado em diferentes dias relativamente a 6 das estirpes estudadas: ATCC 35218, IMP NCTC 13476, ATCC 700603, CCUG 59627, BAA 1705 e OXA-48.

3.1.5. Avaliação da suscetibilidade pelo método de referência

A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de referência microdiluição em caldo, de acordo com os protocolos EUCAST e CLSI (CLSI, 2015; EUCAST, 2017). Resumidamente, foram preparadas diluições seriadas de cada um dos antimicrobianos (tabela II), em meio MH Ca²⁺ (Sigma-Aldrich) e distribuídos 100 µL de cada diluição numa microplaca de 96 poços de poliestireno (CLSI, 2015). Posteriormente, preparou-se uma suspensão celular em soro fisiológico (Sigma-Aldrich) ajustada a 0,5 McFarland. Em seguida, este inóculo foi diluído 1:100 em meio MH Ca²⁺ (Sigma-Aldrich) de forma a obter uma suspensão com uma concentração aproximada de 1 x 10⁶ UFC/mL. Relativamente ao estudo dos mecanismos de resistência foram utilizados os protocolos do EUCAST (Giske *et al.*, 2017).

Tabela II: Fármacos usados na avaliação da suscetibilidade pelo método de referência e as concentrações testadas pelos protocolos EUCAST e CLSI (CLSI, 2017; EUCAST, 2018)

Fármacos	Fabricante	Concentrações testadas ($\mu\text{g/mL}$)	
		EUCAST	CLSI
Amicacina	Farmacopeia Europeia A0368000	32 – 0,06	
Ampicilina	Farmacopeia Europeia A1000000	32 – 0,06	
Amoxicilina/Ác. Clavulânico	Amoxicilina - Farmacopeia Europeia A0800000 Ác. Clavulânico - Sigma 33454	Amoxicilina – 32 – 0,06 Ác. Clavulânico – 2	Amoxicilina - 32 – 0,06 Ác. Clavulânico – 16 – 0,03
Ceftazidima	Farmacopeia Europeia C0690500	32 – 0,06	
Ciprofloxacina	Farmacopeia Europeia Y0000198	8 – 0,015	
Gentamicina	Farmacopeia Europeia G0200000	16 – 0,03	
Colistina	Farmacopeia Europeia C2700000	16 – 0,03	
Ceftolozane/ Tazobactam	Ceftolozane - Merck, Itália 936111-69-2 Tazobactam - Sigma T2820	Determinada por ϵ -test (Liofilchem)	
Cefotaxima	Farmacopeia Europeia Y0000420	32 – 0,06	
Imipenemo	Farmacopeia Europeia I0090000	32 – 0,06	
Meropenemo	Farmacopeia Europeia Y0001252	32 – 0,06	
Piperacilina/ Tazobactam	Piperacilina - Farmacopeia Europeia P1890000 Tazobactam - Sigma T2820	Piperacilina – 124 – 0,25 Tazobactam - 4	

3.2. Seleção e preparação das amostras clínicas de urina

3.2.1. Amostras de urina

As 139 amostras de urina incluídas neste estudo foram fornecidas pelo Grupo UNILABS, Laboratório Dr. Carlos Torres, Porto, Portugal, e transportadas adequadamente para o Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), para posterior processamento e análise. Após chegarem ao Laboratório de Microbiologia, as amostras foram imediatamente processadas, ou quando não foi possível o seu processamento, foram armazenadas a 4°C até um máximo de um dia.

3.2.2. Análise e avaliação das amostras de urina pelo citómetro de fluxo Sysmex UF-1000i

As amostras foram introduzidas no citómetro Sysmex UF-1000i (Sysmex Co, Japão) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração celular bacteriana e a identificação preliminar em cocos ou bacilos, foram registadas. As amostras analisadas que demonstraram valores superiores a 1×10^5 bacilos/mL foram incluídas neste estudo. Por sua vez, as amostras classificadas como ‘cocos/mistura’ ou com contagens inferiores a 1×10^5 /mL não foram incluídas neste estudo.

Paralelamente, procedeu-se à quantificação da bacteriúria por meio da determinação das Unidades Formadoras de Colónias (UFC) da urina; para tal realizou-se diluições seriadas da amostra e subsequente cultura de 50 µL de cada diluição em meio BHA (Liofilchem). As placas de BHA (Liofilchem) foram incubadas a 37°C durante 24 h e o número de UFC foi quantificado e comparado com os resultados obtidos no Sysmex UF-1000i (Sysmex Co.). O microrganismo obtido foi conservado a -80°C em meio líquido BH (Liofilchem) suplementado com 20% de glicerol (Frilabo).

3.2.3. Otimização do protocolo para extração dos microrganismos a partir da urina e avaliação da sua eficácia

Para identificação e avaliação da suscetibilidade dos microrganismos presentes na urina, as amostras com contagens de bacilos Gram-negativo superiores a 10^5 /mL no Sysmex UF-1000i (Sysmex Co.) foram concentradas e “purificadas”; de forma a retirar a maioria dos componentes celulares/detritos presentes na urina (células epiteliais, leucócitos, eritrócitos). Para tal, foram transferidos 4 mL de urina para um tubo de gel de 5,5 mL, BD Vacutainer® Barricor™ LH Plasma (Becton Dickinson and Company, EUA), o qual foi centrifugado a $1500 \times g$ durante 5 min; o sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL (nerbe plus GmbH, Alemanha) e novamente centrifugado a $4000 \times g$ durante 5 min. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado.

A quantificação das bactérias recuperadas após processamento foi efetuada por contagem do número de UFC e considerado eficaz quando se recuperou um número superior a 10^6 UFC/mL necessário para inocular o *kit* de avaliação da suscetibilidade da FASTinov®.

3.3. Identificação bacteriana por espectrometria de massa diretamente a partir da amostra de urina purificada

Após o protocolo de extração das bactérias das amostras de urina, o *pellet* obtido, com o auxílio de um palito, foi colocado em 4 *spots* da placa específica do MALDI-TOF até secar. De seguida, adicionou-se 1 µL da matriz em cada *spot* e deixou-se de novo secar. A placa foi colocada no espectrómetro MALDI-TOF (Bruker Portugal Unipessoal, LDA, Portugal) e a identificação do microrganismo foi registada. Foi validada a identificação obtida em qualquer dos 4 *spots*. A identificação obtida foi comparada com a obtida na rotina hospitalar por *MicroScan WalkAway* (Siemens, Portugal) a partir de colónias isoladas.

3.4. Prova de conceito em amostras clínicas urinárias

3.4.1. Amostras clínicas de urina positivas para bacilos Gram-negativo

As amostras de urina provenientes de doentes foram fornecidas pelo Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto (Hospital Santo António, Portugal) após *screening* pelo citómetro UF-1000i (Sysmex Co.). Foram incluídas neste estudo 10 amostras positivas para bacilos Gram-negativo com contagens superiores a 1×10^5 bactérias/mL. Todas as amostras foram colhidas em tubos de 10 mL sem qualquer conservante químico, transportadas e refrigeradas para o Laboratório de Microbiologia da FMUP.

3.4.2. Processamento das amostras para identificação direta no MALDI-TOF e análise da suscetibilidade por citometria de fluxo

As amostras foram processadas de acordo com o protocolo previamente otimizado (ponto 3.2.3.) para identificação no MALDI-TOF (Bruker) e inoculação do *kit* FASTinov® gramneg. O *kit* foi inoculado com a suspensão bacteriana obtida e acertada a 0,5 McFarland, incubado durante 1 h a 37°C, com agitação, e de seguida, analisado pelo citómetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences). Os resultados do citómetro foram obtidos automaticamente de acordo com os protocolos EUCAST e CLSI usando o *software* desenvolvido pela FASTinov.

3.4.3. Processamento das amostras pelo método de rotina

Pelo método de rotina, as amostras foram semeadas em meio CLED (*Cystine Lactose Electrolyte Deficient*, BioMérieux, França), semi-quantificadas, identificadas e avaliada a

sua suscetibilidade no *Vitek 2* (BioMérieux) realizado pelo Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto. Relativamente ao ceftolozane/tazobactam foi realizado o ϵ -test visto não estar incluída na carta do *Vitek 2* e à colistina foi feita a microdiluição em caldo por ser a única técnica neste momento validada (EUCAST & CLSI, 2016). Os resultados foram obtidos 48 h após a colheita das amostras.

3.5. Análise estatística

A avaliação da suscetibilidade das estirpes de controlo de qualidade por citometria de fluxo foi determinada através de valores de *cutoff* previamente calculados para cada um dos fármacos presentes no *kit* FASTinov[®], os quais permitiram classificar se a estirpe é S, R ou I ao fármaco em estudo. O resultado obtido pelo protocolo citométrico foi comparado com o resultado obtido pelo método de referência, microdiluição em caldo. A proporção de concordância entre os métodos foi determinada para ambos os protocolos, EUCAST e CLSI. Foi ainda determinada a proporção de erros *minor*, *major* e *very major*. Um erro *minor* ocorre quando o método de referência dá um resultado R ou S e a citometria de fluxo fornece um I, ou quando, o método de referência dá um resultado I e a citometria de fluxo fornece um resultado S ou R; verifica-se um erro *major* quando o método de referência fornece um resultado S e a citometria de fluxo fornece um resultado R; por último, verifica-se um erro *very major* quando o método de referência fornece um resultado R e a citometria de fluxo fornece um resultado S (ISO 20776-2).

A reprodutibilidade do *kit* FASTinov[®] estudada em dois dias distintos foi avaliada com recurso ao coeficiente Kappa de Cohen.

As concentrações celulares bacterianas das amostras de urina definidas pelo citómetro de fluxo Sysmex UF-1000i (Sysmex Co.) e pela determinação de UFC foram comparadas. Foi estudada a normalidade das variáveis a fim de determinar a aplicação de testes paramétricos ou não paramétricos. Como as variáveis seguiram uma distribuição não normal aplicou-se o teste de Wilcoxon. Foi considerado um nível de significância de 0,05.

Os resultados obtidos da prova de conceito foram comparados, a proporção de concordância foi calculada e os erros quantificados e classificados utilizando como métodos de referência o *Vitek 2* (BioMérieux), microdiluição em caldo (colistina) e ϵ -test (ceftolozane/tazobactam) para a avaliação da suscetibilidade.

Deteção da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras de urina infectadas

Os testes estatísticos foram realizados no *software* estatístico IBM SPSS (versão 24,0, IBM Corporation, Somers, Nova Iorque, EUA).

4. Resultados

4.1. Validação do *kit* FASTinov[®] gramneg

4.1.1. Caracterização das estirpes bacterianas ATCC

Antes de se proceder à validação do *kit* FASTinov[®] gramneg, efetuou-se a caracterização fenotípica das estirpes bacterianas ATCC pelo método de referência, microdiluição em caldo e pelo ϵ -test para o ceftolozane/tazobactam. O fenótipo encontrado correspondeu ao esperado e está apresentado nas tabelas III e IV.

Tabela III: Resultados dos fenótipos obtidos no método de referência, microdiluição em caldo para as estirpes bacterianas ATCC para os protocolos EUCAST e CLSI

Estirpes ATCC	Teste de suscetibilidade - microdiluição em caldo																							
	AMP		AK		AUG		TZP		CN		CIP		CTX		CAZ		MRP		IMI		Colistina			
	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	CLSI 2017	EUCAST 2018	
ATCC 35218	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NCTC 13846 MCR-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
ATCC 8739	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IMP NCTC 13476	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
BAA 1705	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
BAA 1706	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
ATCC 700603	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
OXA-48	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
NCTC 13443 NDM-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
CCUG 59627	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
ATCC 27853	-	-	S	S	-	-	S	S	S	S	S	S	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IMP-8	-	-	S	S	-	-	S	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
ATCC 13048	R	R	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S

AMP – Ampicilina; AK – Amicacina; AUG – Amoxicilina/Ácido Clavulânico; TZP – Piperacilina/Tazobactam; CN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; CTX – Cefotaxima; CAZ – Cefazidima; MRP – Meropenem; IMI – Imipenem; CS-colistina

Tabela IV: Resultados dos fenótipos obtidos no ϵ -test para as estirpes bacterianas ATCC para os protocolos EUCAST e CLSI

Estirpes ATCC	Teste de suscetibilidade ϵ -test	
	CT	
	EUCAST 2018	CLSI 2017
ATCC 35218	S	S
NCTC 13846 MCR-1	S	S
ATCC 8739	S	S
IMP NCTC 13476	R	R
BAA 1705	R	R
BAA 1706	S	S
ATCC 700603	S	S
OXA-48	I	I
NCTC 13443 NDM-1	R	R
CCUG 59627	R	R
ATCC 27853	R	S
IMP-8	R	R
ATCC 13048	S	S

CT – Ceftolozane/Tazobactam

4.1.2. Validação do *kit* FASTinov[®] gramneg com urinas inoculadas

Nas figuras IV e V estão representados exemplos representativos da análise citométrica de 2 estirpes ATCC.

Deteção da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras de urina infectadas

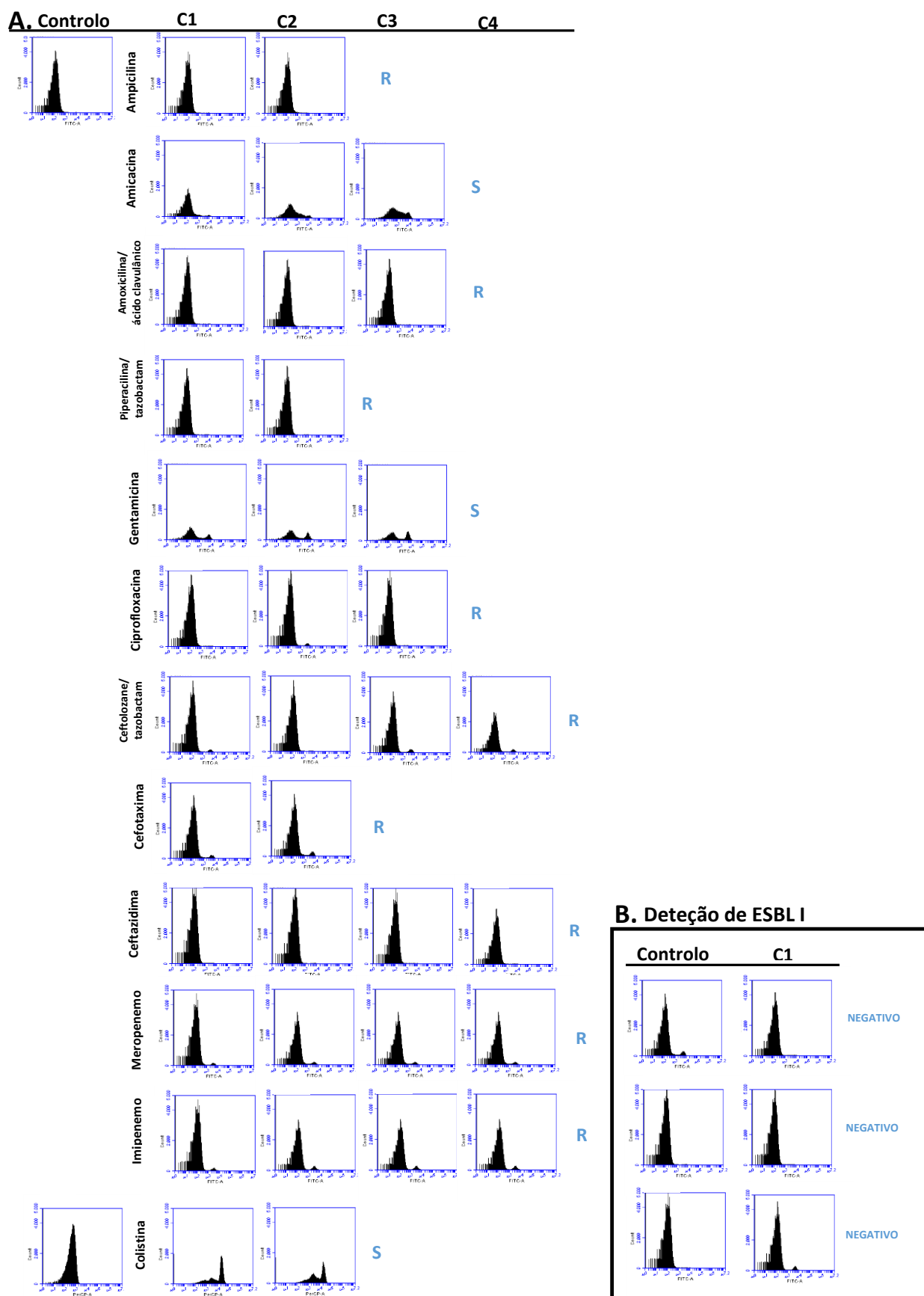


Figura IV: Histogramas representativos da distribuição de fluorescência apresentada para a estirpe de controlo de qualidade *K. pneumoniae* BAA 1705 após incubação de 1 h no *kit* FASTinov® gramneg. **A.** Avaliação da suscetibilidade aos fármacos em estudo e respetiva interpretação fenotípica. **B.** Deteção da presença de ESBL tipo I. Controlo – Células viáveis (não tratadas) marcadas com o respetivo marcador de fluorescência; C1, C2, C3 e C4 - concentrações seriadas de cada antimicrobiano em $\mu\text{g/mL}$.

Deteção da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras de urina infectadas

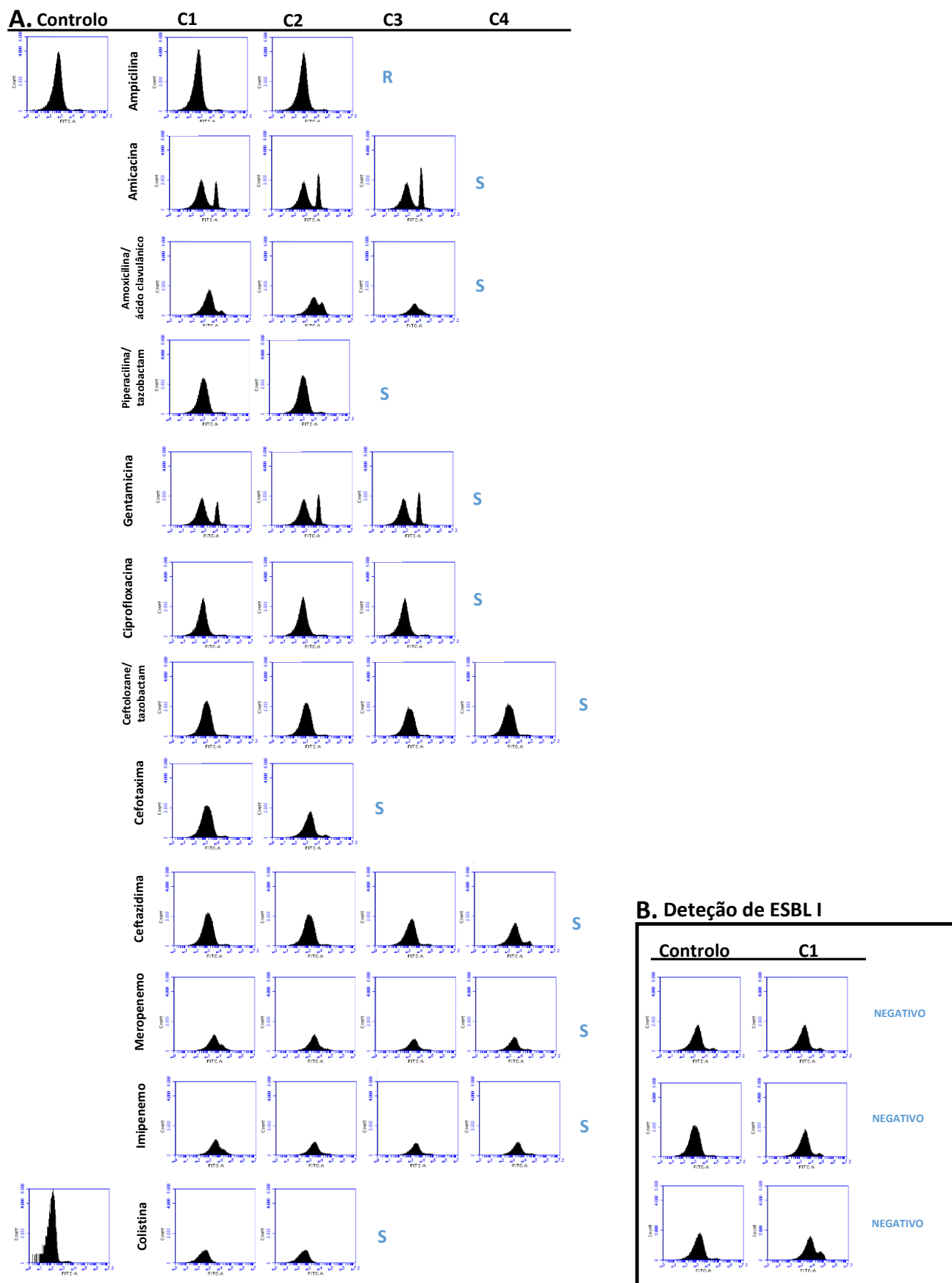


Figura V: Histogramas representativos da distribuição de fluorescência apresentada para a estirpe de controlo de qualidade *E. coli* ATCC 35218 após incubação de 1 h no kit FASTinov® gramneg. **A.** Avaliação da suscetibilidade aos fármacos em estudo e respetiva interpretação fenotípica. **B.** Deteção da presença de ESBL tipo I. Controlo – Células viáveis (não tratadas) marcadas com o respetivo marcador de fluorescência; C1, C2, C3 e C4 concentrações seriadas de cada antimicrobiano em µg/mL.

Para a validação do *kit* FASTinov® gramneg, foi feita uma comparação dos resultados obtidos pelo protocolo citométrico com os resultados obtidos pelos métodos microdiluição em caldo e ϵ -test apenas para o ceftolozane/tazobactam para ambos os protocolos EUCAST (tabela V) e CLSI (tabela VI).

Tabela V: Taxa de erros do *kit* FASTinov® gramneg e a proporção de concordância com o método de referência para o protocolo EUCAST relativamente às urinas inoculadas com as estirpes bacterianas ATCC

	Método de referência			<i>kit</i> FASTinov® gramneg vs método de referência			
	S	R	I	mE	ME	VME	PC (%)
Ampicilina	2	9	-	-	-	-	100,0
Amicacina	9	3	1	1/13	-	1/3	85,0
Amoxicilina/Ác. Clavulânico	4	7	-	-	-	-	100,0
Piperacilina/Tazobactam	8	5	-	-	-	-	100,0
Gentamicina	9	4	-	-	-	-	100,0
Ciprofloxacina	6	7	-	1/13	-	1/7	85,0
Ceftolozane/Tazobactam	6	6	1	1/13	-	-	92,3
Cefotaxima	5	6	-	-	-	1/6	92,3
Ceftazidima	7	6	-	-	-	-	100,0
Meropenemo	9	3	1	2/13	-	-	85,0
Imipenemo	8	4	1	1/13	-	2/4	77,0
Colistina	12	1	-	-	-	-	100,0
Total	85	61	4	6/137	-	5/61	92,7

S - Suscetível; R - Resistente; I - Intermediário; mE - Erros *minor*; ME - Erros *major*; VME - Erros *very major*; PC - Proporção de concordância.

Tabela VI: Taxa de erros do *kit* FASTinov® gramneg e a proporção de concordância com o método de referência para o protocolo CLSI relativamente às urinas inoculadas com as estirpes bacterianas ATCC

	Método de referência			<i>kit</i> FASTinov® gramneg vs método de referência			
	S	R	I	mE	ME	VME	PC (%)
Ampicilina	2	9	-	-	-	-	100,0
Amicacina	10	3	-	-	-	1/3	92,3
Amoxicilina/Ác. Clavulânico	4	6	1	-	-	-	100,0
Piperacilina/Tazobactam	8	5	-	-	-	-	100,0
Gentamicina	9	4	-	1/13	-	-	92,3
Ciprofloxacina	6	6	1	-	-	1/3	92,3
Ceftolozane/Tazobactam	7	5	1	1/13	-	1/5	85,0
Cefotaxima	5	6	-	-	-	1/6	92,3
Ceftazidima	7	6	-	-	-	-	100,0
Meropenemo	9	4	-	-	-	1/4	92,3
Imipenemo	6	4	3	6/13	-	-	54,0
Colistina	12	1	-	-	-	-	100,0
Total	85	59	6	8/137	-	5/59	92,0

S - Suscetível; R - Resistente; I - Intermediário; mE - Erros *minor*; ME - Erros *major*; VME - Erros *very major*; PC - Proporção de concordância.

A proporção de concordância entre o *kit* FASTinov® gramneg e o método de referência foi de 92,7% e 92,0% para os protocolos EUCAST e CLSI, respetivamente.

No entanto, foram detetadas discrepâncias em ambos os protocolos. No caso dos fármacos amicacina e ciprofloxacina, observou-se 1 erro *very major* em ambos os protocolos e 1 erro *minor* no protocolo EUCAST. Por outro lado, para a associação ceftolozane/tazobactam foi detetado 1 erro *minor* em ambos os protocolos e ainda um erro *very major* no protocolo CLSI. Um erro *very major* foi observado na cefotaxima em ambos os protocolos. No meropenemo verificou-se a presença de 2 erros *minor* no protocolo EUCAST e 1 erro *very major* no CLSI. Para o imipenemo foi detetado 1 erro *minor* e 2 erros *very major* no protocolo EUCAST e 6 erros *minor* no protocolo CLSI. Por último, observou-se um erro *minor* para a gentamicina no protocolo CLSI. De acordo com as tabelas V e VI, não se verificou erros *major*.

A deteção de ESBL foi de 100%, a única ESBL positiva foi a estirpe bacteriana ATCC 700603, a qual foi confirmada por citometria de fluxo.

4.1.3. Reprodutibilidade do *kit* FASTinov® gramneg

Para o estudo da reprodutibilidade verificou-se um valor de *K* igual a 0,96, onde as estirpes CCUG 59627, ATCC 35218 e OXA-48 tiveram um valor de *K* igual a 1,00 e as estirpes ATCC 700603, IMP NCTC 13476, BAA 1705 ligeiramente inferior a 1,00 (tabela VII).

Tabela VII: Estudo da reprodutibilidade feita em dois dias distintos para as 6 estirpes ATCC estudadas

Estirpes ATCC	Valor de <i>K</i>
ATCC 700603	0,93
CCUG 59627	1,00
IMP NCTC 13476	0,93
BAA 1705	0,93
ATCC 35218	1,00
OXA 48	1,00
Total	0,96

4.2. *Screening* pelo citómetro Sysmex UF-1000i

Das 139 amostras clínicas de urina que foram analisadas pelo Sysmex UF-1000i, 82 foram consideradas positivas (bacilos com contagens superiores a 1×10^5 bactérias/mL, figura VI). As outras 57 amostras analisadas pelo Sysmex UF-1000i não foram incluídas no estudo porque 14 destas eram negativas (contagens inferiores a 1×10^5 bactérias/mL), 22 mostraram população ‘cocos/mistura’ (figura VII) e as restantes 21 amostras apresentaram valores superiores a 1×10^5 bactérias/mL mas sem identificação acerca da morfologia (bacilos ou ‘cocos/mistura’).

Deteção da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras de urina infectadas

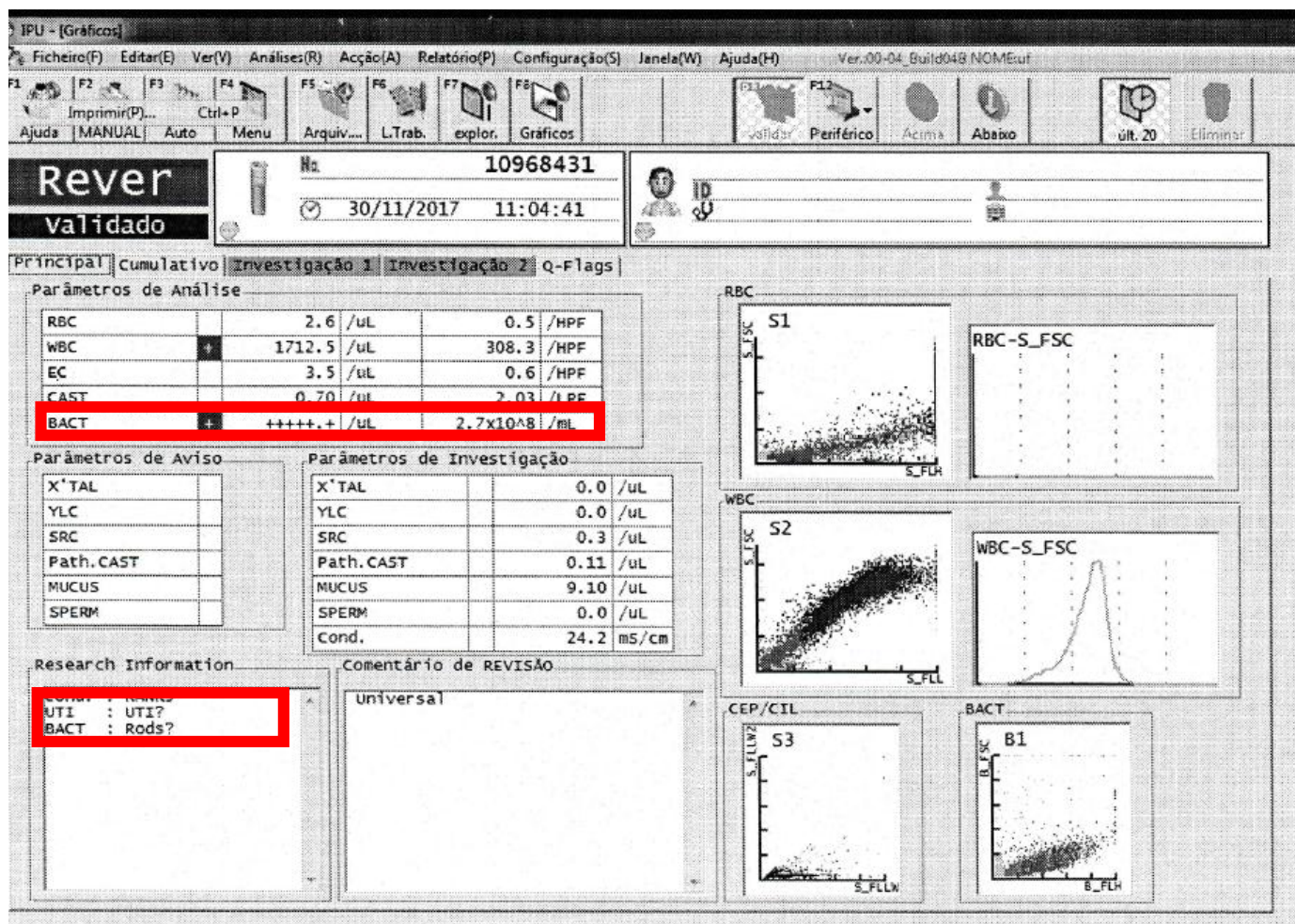


Figura VI: Exemplo de um resultado do Sysmex UF-1000i para uma amostra clínica de urina com bacilos Gram-negativo com uma contagem de $2,7 \times 10^8$ bactérias/mL evidenciado com retângulos vermelhos.

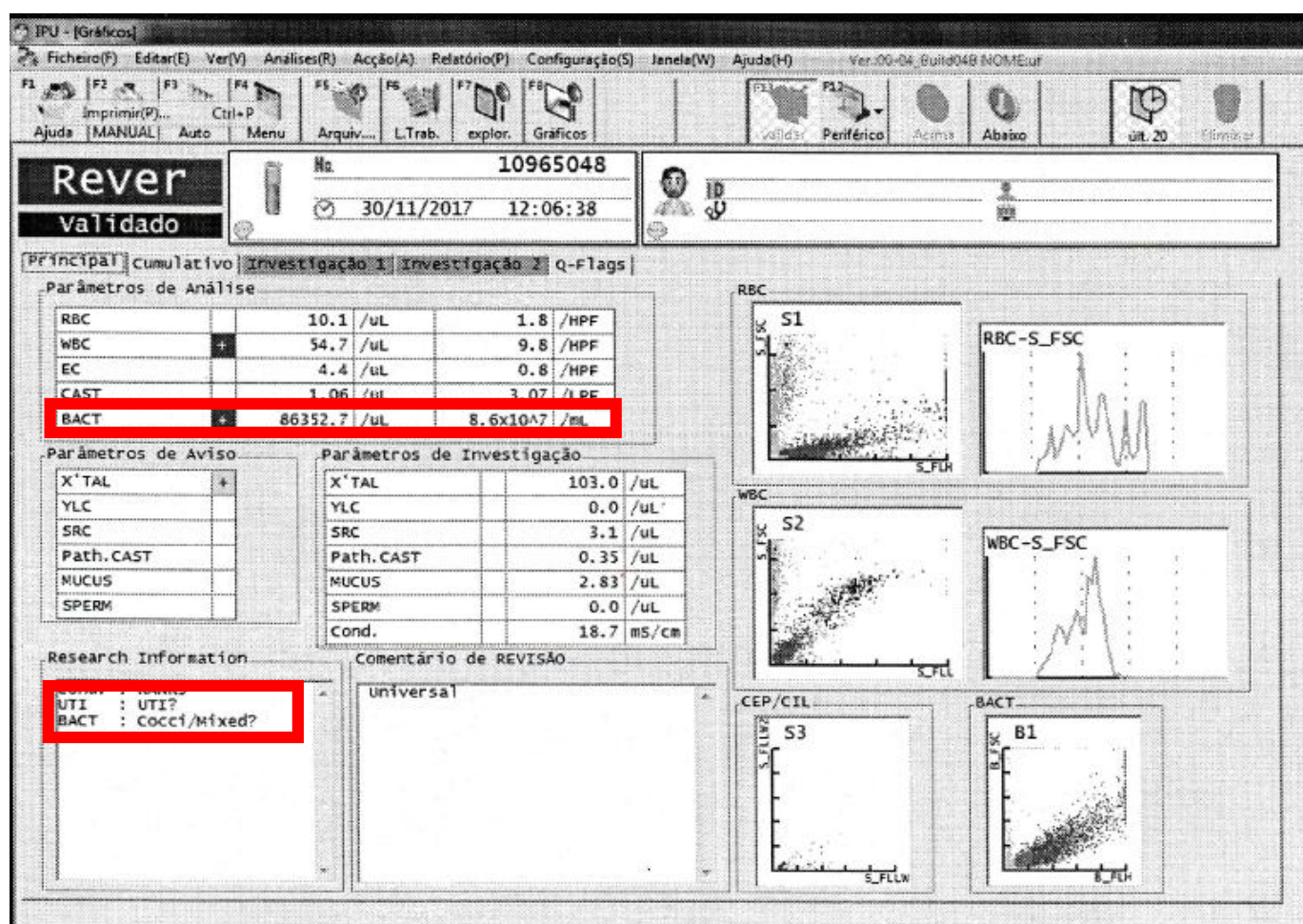


Figura VII: Exemplo de um resultado do Sysmex UF-1000i para uma amostra clínica de urina com ‘cocos/mistura’ com uma contagem de $8,6 \times 10^7$ bactérias/mL evidenciado com retângulos vermelhos.

Relativamente à determinação da concentração de bactérias na urina foram observadas contagens bacterianas superiores no Sysmex UF-1000i, e ainda, verificou-se diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,044$) entre os métodos Sysmex UF-1000i e a determinação de UFC. No entanto, nas amostras de urina onde foram registadas diferenças, essas não excederam um logaritmo (bactérias/mL).

O Sysmex UF-1000i mostrou assim ser promissor na seleção das amostras realmente positivas que é essencial para se poder dar início ao teste de suscetibilidade por citometria de fluxo.

4.3. Identificação das amostras positivas pelo MALDI-TOF

Para a identificação dos microrganismos diretamente a partir da amostra de urina, o MALDI-TOF apresentou os seguintes resultados (analisadas 63 amostras das 82 positivas): *E. coli* (68,3%), *K. pneumoniae* (9,5%), *Enterobacter* spp. (4,8%), *Aeromonas* (1,6%), *P. mirabilis* (1,6%), *Providencia stuartis* (1,6%) e *P. aeruginosa* (1,6%). No entanto, cerca de 11,1% dos isolados não foi possível identificar no MALDI-TOF (figura VIII). As amostras sem identificação foram amostras para as quais não se obteve *pellet* durante a sua preparação. Estas amostras foram identificadas no *MicroScan WalkAway* como: *E. coli* (5), *Enterobacter* spp. (1) e *P. mirabilis* (1).

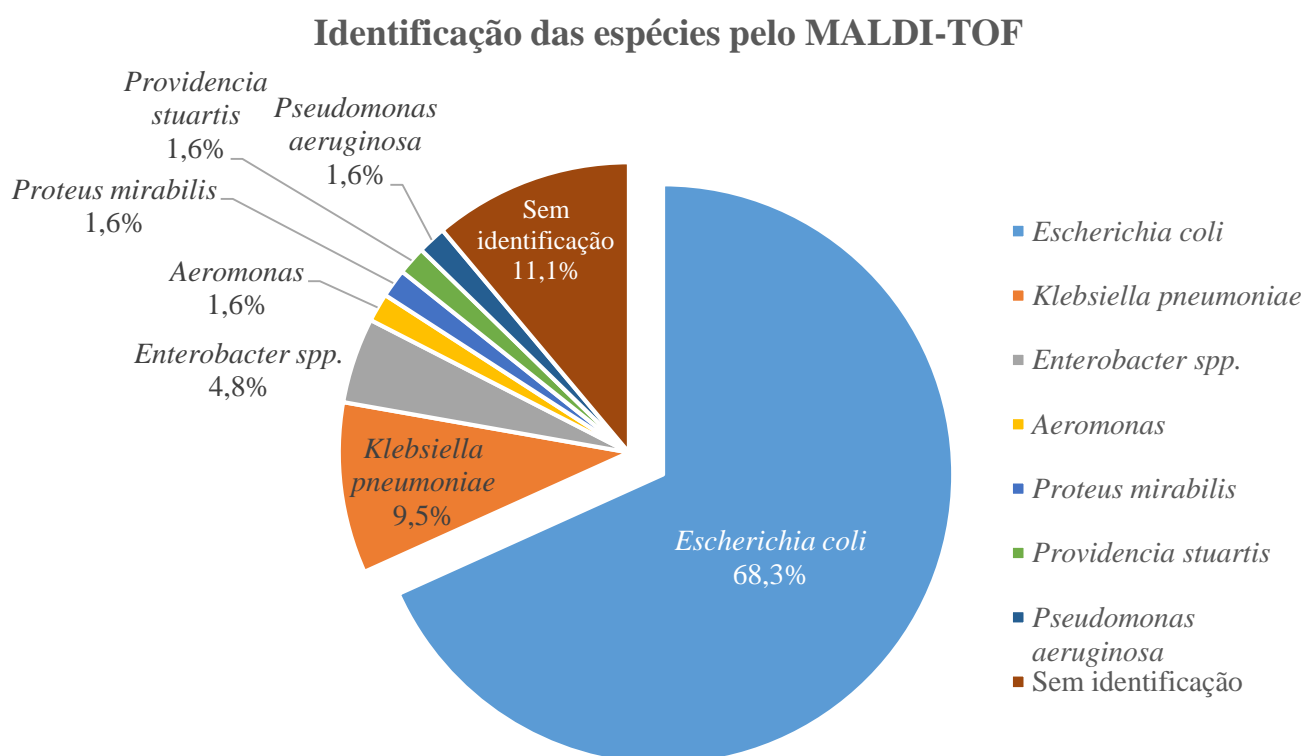


Figura VIII: Distribuição dos isolados identificados pelo MALDI-TOF.

4.4. Prova de conceito em amostras urinárias de doentes

Dez amostras de doentes consideradas positivas no Sysmex UF1000i foram utilizadas para identificação pelo MALDI-TOF e realização do teste de suscetibilidade por citometria de fluxo.

Relativamente à identificação pelo MALDI-TOF, observou-se que a grande maioria dos isolados correspondiam a *E. coli* (30 %) e *K. pneumoniae* (30 %), *Proteus mirabilis* (30 %) e os restantes 10 % a *E. cloacae* (figura IX).

Identificação das espécies pelo MALDI-TOF

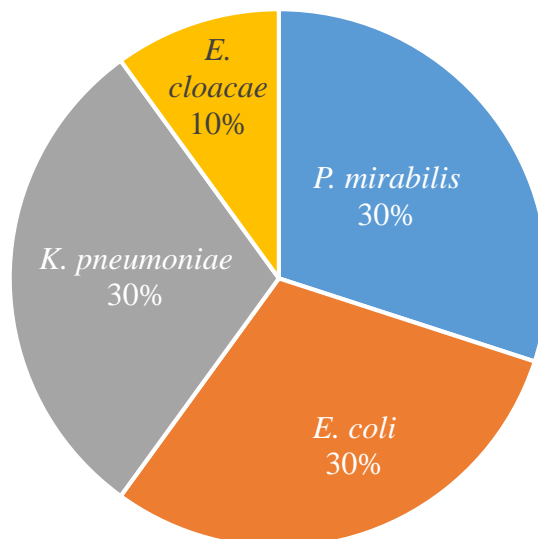


Figura IX: Distribuição dos isolados das amostras de urina de doentes identificados pelo MALDI-TOF.

Os resultados da suscetibilidade destas urinas por citometria de fluxo (tabela X) foi registado e comparado com o método de rotina representados na tabela VIII. Os resultados da suscetibilidade para a colistina e ceftolozane/tazobactam estão representados na tabela IX.

Tabela VIII: Resultados dos fenótipos obtidos pelo *Vitek 2* para as amostras de urina de doentes

Testes de suscetibilidade - <i>Vitek 2</i>										
Urinas doentes	AMP	AK	AUG	TZP	CN	CIP	CTX	CAZ	MRP	IMI
	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018	EUCAST 2018
M838339UR	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
M838415UR	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S
M851064UR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M850914UR	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
M850833UR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M850889UR	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
M851221UR	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
M851209UR	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M851993UR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M852116UR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP – Ampicilina; AK – Amicacina; AUG – Amoxicilina/Ácido Clavulânico; TZP – Piperacilina/Tazobactam; CN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; CTX – Cefotaxima; CAZ – Ceftazidima; MRP – Meropenemo; IMI – Imipenemo

Tabela IX: Resultados dos fenótipos obtidos na microdiluição em caldo para o fármaco colistina e no ϵ -test para o ceftolozane/tazobactam para as amostras de urina de doentes

Urinas doentes	Testes de suscetibilidade	
	ϵ -test	Microdiluição em caldo
	CT	Colistina
	EUCAST 2018	EUCAST 2018
M838339UR	S	R
M838415UR	S	S
M851064UR	S	S
M850914UR	S	S
M850833UR	S	R
M850889UR	S	S
M851221UR	S	S
M851209UR	S	S
M851993UR	S	R
M852116UR	S	S

CT – Ceftolozane/Tazobactam

Tabela X: Taxa de erros do *kit* FASTinov[®] gramneg e a proporção de concordância com o método de rotina, *Vitek 2* para o protocolo EUCAST

	<i>Vitek 2</i>			<i>kit</i> FASTinov [®] gramneg vs <i>Vitek 2</i>			
	S	R	I	mE	ME	VM	PC (%)
Ampicilina	5	5	-	-	-	1/5	90,0
Amicacina	9	-	1	1/10	-	-	90,0
Amoxicilina/Ác. clavulânico	5	5	-	-	-	2/5	80,0
Piperacilina/Tazobactam	10	-	-	1/10	-	-	90,0
Gentamicina	10	-	-	-	-	-	100,0
Ciprofloxacina	10	-	-	-	1/10	-	90,0
Ceftolozane/Tazobactam*	10	-	-	-	-	-	100,0
Cefotaxima	10	-	-	-	-	-	100,0
Ceftazidima	10	-	-	-	-	-	100,0
Meropenemo	10	-	-	-	-	-	100,0
Imipenemo	10	-	-	-	1/10	-	90,0
Colistina**	7	3	-	-	-	-	100,0
Total	106	13	1	2/120	2/106	3/13	95,0

S – Suscetível; R – Resistente; I – Intermediário; mE – Erros *minor*; ME – Erros *major*; VM – Erros *very major*; PC – Proporção de concordância; * Realizado pelo ϵ -test; ** Realizado pela microdiluição em caldo.

Após a análise, verificou-se que a proporção de concordância entre os resultados obtidos pelo *Vitek 2*, microdiluição em caldo e ϵ -test com os do *kit* FASTinov[®] gramneg foi de 95,0% e ainda foram detetadas algumas discrepâncias no protocolo EUCAST. Neste protocolo observou-se um total de 7 disparidades para os fármacos ampicilina, amicacina, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina e imipenemo. Resumidamente, foram detetados 2 erros *minor* para os fármacos amicacina e piperacilina/tazobactam; 2 erros *major* para a ciprofloxacina e imipenemo e 2 erros *very major* para a amoxicilina/ácido clavulânico e 1 erro *very major* para a ampicilina. Estes erros foram confirmados usando o método de difusão em disco.

A deteção de ESBL tipo I foi de 100% e todas as amostras de urina de doentes foram ESBL negativas confirmadas por citometria de fluxo.

5. Discussão dos resultados e Conclusão

As ITU são das infeções mais comuns em todo mundo, causadas principalmente por bacilos Gram-negativo, que afetam substancialmente a qualidade de vida das pessoas levando ao aumento de custos económicos e de riscos para a saúde pública. Face a esta realidade é necessário desenvolver técnicas e estratégias para um melhor diagnóstico destas infeções e, conseqüentemente adquirir um melhor tratamento para cada doente, evitando a terapêutica empírica. A instituição desta terapêutica, frequentemente de largo espectro tem conseqüências para o doente porque existe o risco de não ser adequada e, para a sociedade pois é conhecido que o uso excessivo de antimicrobianos conduziu a um aumento das resistências. O diagnóstico etiológico é reconhecido como muito importante mas demorado, obrigando à instituição de terapêutica antes da obtenção do resultado (Davenport *et al.*, 2017; Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Sendo assim, o objetivo principal deste estudo foi desenvolver um método rápido para o diagnóstico de ITU que permita a instituição da terapêutica adequada à situação clínica. Primeiramente, procedeu-se à validação do *kit* FASTinov[®] gramneg a fim de se determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras de urina inoculadas com bacilos Gram-negativo. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que o *kit* FASTinov[®] gramneg é uma excelente ferramenta para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos a partir de amostras de urina em tempo útil (menos de 2 horas *versus* as 48 horas requeridas pelos métodos implementados na rotina). A proporção de concordância obtida para a avaliação da suscetibilidade a partir de urinas de dadores saudáveis inoculadas com as estirpes de controlo de qualidade foi elevada para ambos os protocolos EUCAST e CLSI, estando os valores de acordo com o limite definido pela ISO 20776-2 ($\geq 90\%$). Relativamente aos erros apresentados pelo *kit* FASTinov[®] gramneg, não foram observados erros *major* para os protocolos EUCAST e CLSI mas foram detetados alguns erros *very major* sobretudo para o imipenemo no protocolo EUCAST (2/4), para a amicacina em ambos os protocolos (1/3) e para a ciprofloxacina no protocolo CLSI (1/3). Em geral, o protocolo CLSI apresentou uma maior taxa de erros relativamente ao protocolo EUCAST, o que pode ser justificado pelo facto do CLSI apresentar valores de *breakpoints* mais elevados do que o EUCAST. Uma possível justificação para os erros apresentados por este novo método pode relacionar-se com o facto de a análise da suscetibilidade ter sido realizada de acordo com os valores de *cutoffs* definidos para a

avaliação da suscetibilidade a partir de hemoculturas positivas, uma vez que este *kit* foi previamente validado e otimizado para estudos do perfil de suscetibilidade em hemoculturas, apresentando também uma excelente concordância com o método utilizado na rotina (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2017). Para além disso, o *kit* FASTinov[®] gramneg apresentou uma elevada reprodutibilidade para as estirpes estudadas. Assim, a utilização deste *kit* permitiu a avaliação da suscetibilidade em amostras de urina em tempo útil, permitindo uma reposta mais dirigida a cada doente, e assim, contribuindo para o controlo e diminuição das resistências aos antimicrobianos.

Os laboratórios de rotina recebem para exame bacteriológico de urina um elevado número de amostras mal colhidas o que pode levar a resultados incorretos e ao desperdício de tempo e trabalho nestas amostras. Para evitar isso, vários equipamentos foram recentemente desenvolvidos com o intuito de auxiliar no diagnóstico de ITU. O citómetro de fluxo Sysmex UF-1000i tem sido reportado como uma ferramenta útil no diagnóstico das ITU por ser um bom sistema para seleccionar as amostras de urina negativas e assim evitar o seu processamento, reduzindo o trabalho laboratorial (Davenport *et al.*, 2017; De Rosa *et al.*, 2010; Inigo *et al.*, 2016; J. Wang *et al.*, 2010). Neste estudo as amostras clínicas de urina foram analisadas no citómetro Sysmex UF-1000i, para efetuar o *screening* das amostras positivas para bacilos Gram-negativo tendo sido demonstrada, para este objetivo elevada acuidade.

A partir das amostras positivas para bacilos Gram-negativo seleccionadas pelo Sysmex UF-1000i, foi otimizado um protocolo de extração dos microrganismos para posteriormente identificação da espécie. Dado que a interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade é espécie-dependente, era relevante obter a identificação do microrganismo diretamente a partir da amostra de urina usando a espectrometria de massa MALDI-TOF antes de realizar a avaliação da suscetibilidade. Embora ainda não implementado na rotina laboratorial, vários estudos referem que o uso do MALDI-TOF é uma técnica útil e rápida na identificação dos microrganismos a partir diretamente da amostra de urina (Davenport *et al.*, 2017; Ferreira, Sanchez-Juanes, Munoz-Bellido, & Gonzalez-Buitrago, 2011; Haiko, Savolainen, Hilla, & Patari-Sampo, 2016). Os resultados obtidos pelo MALDI-TOF foram promissores, no entanto, algumas amostras submetidas ao MALDI-TOF não obtiveram identificação devido a não terem uma quantidade de amostra suficiente. Será de todo o interesse melhorar o protocolo de extração de microrganismos a

partir da urina para permitir a realização da identificação e dos testes de sensibilidade a antimicrobianos de todas as amostras positivas.

A prova de conceito foi efetuada para colocar em prática a utilização dos equipamentos e de todos os procedimentos otimizados. Ou seja, efetuou-se o *screening* das amostras positivas usando o Sysmex UF-1000i, seguidamente, realizou-se o protocolo de extração dos microrganismos para proceder à sua identificação por MALDI-TOF e depois determinar o perfil de suscetibilidade por citometria de fluxo usando o *kit* FASTinov[®] gramneg. Relativamente à comparação dos resultados citométricos com os do *Vitek 2*, microdiluição em caldo (colistina) e ϵ -test (ceftolozane/tazobactam), verificou-se uma proporção de concordância de 95,0% no protocolo EUCAST e ainda, foram detetados 7 discrepâncias, 3 erros *very major*, 2 erros *major* e 2 erros *minor*. Nesta parte do trabalho, apenas se fez a comparação com o protocolo EUCAST, pois é o protocolo neste momento utilizado em Portugal. A avaliação da suscetibilidade à colistina só é válida por microdiluição em caldo e o ceftolozane/tazobactam não está incluído nesta carta do *Vitek 2*. Os 2 erros *very major* detetados para a amoxicilina/ácido clavulânico pode ter sido devido à instabilidade deste fármaco. Estudos farmacológicos de preservação e estabilidade dos fármacos estão em curso.

É importante salientar que o protocolo de determinação da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo usando o *kit* FASTinov[®] gramneg permite obter resultados após cerca de 2 horas em relação ao método clássico que demora cerca de 48 horas.

A combinação do *screening* das amostras de urina por citometria de fluxo (UF-1000i) juntamente com a identificação do microrganismo por MALDI-TOF foi demonstrado por alguns autores como um método rápido e preciso na identificação das bactérias nas amostras de urina com ITU (Oviano *et al.*, 2017; X. H. Wang *et al.*, 2013; Zboromyrska *et al.*, 2016). Juntando a esta combinação, a determinação da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo usando o *kit* FASTinov[®] gramneg, foi possível criar um protocolo rápido que fornecerá o diagnóstico etiológico de uma ITU em 2 horas permitindo a instituição de uma terapêutica dirigida e com grandes hipóteses de sucesso.

No entanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar os resultados obtidos.

6. Perspetivas futuras

Como resultado deste trabalho várias linhas de investigação foram iniciadas nomeadamente:

- Uma validação alargada a um vasto número de amostras clínicas e melhoria do *software* de análise (definição de *cutoff* para urina);

- Após a validação deste método para a urina, seria interessante realizar a validação do *kit* FASTinov® MAR (já desenvolvido pela FASTinov para estudo de bacteremias), para a deteção de mecanismos de resistência sempre que se justificasse, nomeadamente em casos de resistência a cefalosporinas e carbapenemos;

- Será ainda importante otimizar o perfil de suscetibilidade por citometria de fluxo para fármacos com elevado interesse quase exclusivamente no tratamento de ITU nomeadamente a fosfomicina, a nitrofurantoína e o trimetoprim-sulfametoxazol.

7. Bibliografia

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 37(2), 163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
- Arena, F., Viaggi, B., Galli, L., & Rossolini, G. M. (2015). Antibiotic Susceptibility Testing: Present and Future. *Pediatr Infect Dis J*, 34(10), 1128-1130. doi:10.1097/INF.0000000000000844
- Bader, M. S., Loeb, M., & Brooks, A. A. (2017). An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgrad Med*, 129(2), 242-258. doi:10.1080/00325481.2017.1246055
- Biosciences, B. (2018). BD ACCURI C6 PLUS. Retrieved from <http://www.bdbiosciences.com/eu/instruments/research/cell-analyzers/bd-accuri/m/1294932/features/overview>
- Bonkat, G., Pickard, R., Bartoletti, R., Cai, T., Bruyère, F., Geerlings, S. E., . . . Veeratterapillay, R. (2018). EAU guidelines on urological infections. European Association of Urology Web site. Retrieved from <http://uroweb.org/guideline/urological-infections/>
- Chu, C. M., & Lowder, J. L. (2018). Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. *Am J Obstet Gynecol*, 219(1), 40-51. doi:10.1016/j.ajog.2017.12.231
- CLSI. (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100* (27th ed.). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Correia, C., Costa, E., Peres, A., Alves, M., Pombo, G., & Estevinho, L. (2007). Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. *Acta Médica Portuguesa*, 20, 543-549.
- Costa-de-Oliveira, S., Teixeira-Santos, R., Silva, A. P., Pinho, E., Mergulhao, P., Silva-Dias, A., . . . Pina-Vaz, C. (2017). Potential Impact of Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing on the Clinical Management of Gram-Negative Bacteremia Using the FASTinov((R)) Kit. *Front Microbiol*, 8, 2455. doi:10.3389/fmicb.2017.02455
- Davenport, M., Mach, K. E., Shortliffe, L. M. D., Banaei, N., Wang, T. H., & Liao, J. C. (2017). New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nat Rev Urol*, 14(5), 296-310. doi:10.1038/nrurol.2017.20
- De Rosa, R., Grosso, S., Bruschetta, G., Avolio, M., Stano, P., Modolo, M. L., & Camporese, A. (2010). Evaluation of the Sysmex UF1000i flow cytometer for ruling out bacterial urinary tract infection. *Clin Chim Acta*, 411(15-16), 1137-1142. doi:10.1016/j.cca.2010.03.027
- de Souza, R. M., & Olsburgh, J. (2008). Urinary tract infection in the renal transplant patient. *Nat Clin Pract Nephrol*, 4(5), 252-264. doi:10.1038/ncpneph0781
- DGS. (2011). *Norma da Direcção-Geral da Saúde nº 015/2011 de 30/08/2011. Terapêutica de infeções do aparelho urinário (comunidade)*. Lisboa.
- EUCAST. (2017). Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method. Version 5.0. Retrieved from <http://www.eucast.org>
- EUCAST. (2018). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. Retrieved from <http://www.eucast.org>
- EUCAST, & CLSI. (2016). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Retrieved from http://www.eucast.org/guidance_documents/
- Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Munoz-Bellido, J. L., & Gonzalez-Buitrago, J. M. (2011). Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect*, 17(7), 1007-1012. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03339.x
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*, 13(5), 269-284. doi:10.1038/nrmicro3432
- Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*, 113 Suppl 1A, 5S-13S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12113866>
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*, 7(12), 653-660. doi:10.1038/nrurol.2010.190
- Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am*, 28(1), 1-13. doi:10.1016/j.idc.2013.09.003

- Geerts, N., Jansz, A. R., Boonen, K. J., Wijn, R. P., Koldewijn, E. L., Boer, A. K., & Scharnhorst, V. (2015). Urine flow cytometry can rule out urinary tract infection, but cannot identify bacterial morphologies correctly. *Clin Chim Acta*, 448, 86-90. doi:10.1016/j.cca.2015.06.020
- Giske, C. G., Martinez-Martinez, L., Cantón, R., Stefani, S., Skov, R., Glupczynski, Y., . . . Gniadkowski, M. (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0. Retrieved from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
- Glover, M., Moreira, C. G., Sperandio, V., & Zimmern, P. (2014). Recurrent urinary tract infections in healthy and nonpregnant women. *Urol Sci*, 25(1), 1-8. doi:10.1016/j.urols.2013.11.007
- Haiko, J., Savolainen, L. E., Hilla, R., & Patari-Sampo, A. (2016). Identification of urinary tract pathogens after 3-hours urine culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*, 129, 81-84. doi:10.1016/j.mimet.2016.08.006
- Imam, T. H. (2018). Bacterial Urinary Tract Infections (UTIs). Retrieved from <https://www.merckmanuals.com/professional/genitourinary-disorders/urinary-tract-infections-utis/bacterial-urinary-tract-infections-utis#v26438661>
- Inigo, M., Coello, A., Fernandez-Rivas, G., Carrasco, M., Marco, C., Fernandez, A., . . . Ausina, V. (2016). Evaluation of the SediMax automated microscopy sediment analyzer and the Sysmex UF-1000i flow cytometer as screening tools to rule out negative urinary tract infections. *Clin Chim Acta*, 456, 31-35. doi:10.1016/j.cca.2016.02.016
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, 49(11), 1749-1755. doi:10.1086/647952
- José Barbas Rodrigues, F., & Paula Dias Barroso, A. (2011). Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 29(2), 123-131. doi:[https://doi.org/10.1016/S0870-9025\(11\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S0870-9025(11)70016-5)
- Kumar, S., Dave, A., Wolf, B., & Lerma, E. V. (2015). Urinary tract infections. *Disease-a-Month*, 61(2), 45-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2014.12.002>
- Lee, J. B. L., & Neild, G. H. (2007). Urinary tract infection. *Medicine*, 35(8), 423-428. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2007.05.009>
- Manoni, F., Fornasiero, L., Ercolin, M., Tinello, A., Ferrian, M., Hoffer, P., . . . Gessoni, G. (2009). Cutoff values for bacteria and leukocytes for urine flow cytometer Sysmex UF-1000i in urinary tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 65(2), 103-107. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.06.003
- Masajtis-Zagajewska, A., & Nowicki, M. (2017). New markers of urinary tract infection. *Clin Chim Acta*, 471, 286-291. doi:10.1016/j.cca.2017.06.003
- Mazzariol, A., Bazaj, A., & Cornaglia, G. (2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *J Chemother*, 29(sup1), 2-9. doi:10.1080/1120009X.2017.1380395
- Mejuto, P., Luengo, M., & Diaz-Gigante, J. (2017). Automated Flow Cytometry: An Alternative to Urine Culture in a Routine Clinical Microbiology Laboratory? *International Journal of Microbiology*, 2017, 8. doi:10.1155/2017/8532736
- Mendo, A., Antunes, J., Costa, M. d. C., Pereira, P. M., Monteiro, C., Gomes, C. F., & Gomes, J. F. (2009). Frequência de Infecções Urinárias em Ambulatório –dados de um laboratório de Lisboa. Parte I / Frequency in Urinary Infections on Ambulatory Care - data from a Laboratory in Lisbon, Portugal. Part I. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*(2). Retrieved from <http://revistas.ulusofona.pt/index.php/revistasauade/article/view?path=>
- Monsen, T., & Ryden, P. (2017). A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36(9), 1691-1703. doi:10.1007/s10096-017-2964-1
- Oviano, M., Ramirez, C. L., Barbeyto, L. P., & Bou, G. (2017). Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother*, 72(5), 1350-1354. doi:10.1093/jac/dkw579
- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012). Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64(2), 109-130. doi:10.1007/s10616-011-9415-0
- Pina-Vaz, C., Costa-de-Oliveira, S., Silva-Dias, A., Silva, A. P., Teixeira-Santos, R., & Rodrigues, A. G. (2017). Flow Cytometry in Microbiology: The Reason and the Need. In J. Robinson & A. Cossarizza (Eds.), *Single Cell Analysis* (pp. 153-170). Singapore: Springer.
- Rolo, F., Parada, B., & Moreira, P. (2008). *Cistite não complicada na mulher: guia multidisciplinar reconhecido pela Associação Portuguesa de Urologia*: Zambon.

Deteção da suscetibilidade antimicrobiana por citometria de fluxo diretamente a partir de amostras de urina infectadas

- Roos, V., Ulett, G. C., Schembri, M. A., & Klemm, P. (2006). The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. *Infect Immun*, *74*(1), 615-624. doi:10.1128/IAI.74.1.615-624.2006
- Sheerin, N. S. (2015). Urinary tract infection. *Medicine*, *43*(8), 435-439. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.05.007>
- Smelov, V., Naber, K., & Bjerklund Johansen, T. E. (2016). Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. *European Urology Supplements*, *15*(4), 71-80. doi:10.1016/j.eursup.2016.04.002
- Suskind, A. M., Saigal, C. S., Hanley, J. M., Lai, J., Setodji, C. M., Clemens, J. Q., & Urologic Diseases of America, P. (2016). Incidence and Management of Uncomplicated Recurrent Urinary Tract Infections in a National Sample of Women in the United States. *Urology*, *90*, 50-55. doi:10.1016/j.urology.2015.11.051
- Sysmex America, I. (2009). Sysmex UF-1000i. A new generation automated urine particle analyzer. Retrieved from <https://www.sysmex.com/us/en/Products/Urinalysis/Documents/UF-1000i%20Brochure.pdf>
- Walsh, C., & Collins, T. (2017). The pathophysiology of urinary tract infections. *Surgery - Oxford International Edition*, *35*(6), 293-298. doi:10.1016/j.mpsur.2017.03.007
- Wang, J., Zhang, Y., Xu, D., Shao, W., & Lu, Y. (2010). Evaluation of the Sysmex UF-1000i for the diagnosis of urinary tract infection. *Am J Clin Pathol*, *133*(4), 577-582. doi:10.1309/AJCP1GT2JXOCQBCZ
- Wang, X. H., Zhang, G., Fan, Y. Y., Yang, X., Sui, W. J., & Lu, X. X. (2013). Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J Microbiol Methods*, *92*(3), 231-235. doi:10.1016/j.mimet.2012.12.016
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, *93*(3), 965-974. doi:10.1007/s00253-011-3783-4
- Zboromyrska, Y., Rubio, E., Alejo, I., Vergara, A., Mons, A., Campo, I., . . . Vila, J. (2016). Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect*, *22*(6), 561 e561-566. doi:10.1016/j.cmi.2016.01.025