



Rui Miguel de Almeida Gomes

**Infeções do trato urinário: análise de fatores de risco
para resistência antibiótica e desenvolvimento de
modelo de previsão de sucesso da antibioterapia
empírica**

Orientador: Professora Doutora Isabel Cristina Maciel Natário

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Estatística para a Saúde



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Julho/2019

Infeções do trato urinário: análise de fatores de risco para resistência antibiótica e desenvolvimento de modelo de previsão de sucesso da antibioterapia empírica.

Copyright © Rui Miguel de Almeida Gomes, Instituto de Higiene e Medicina Tropical e Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

O Instituto de Higiene e Medicina Tropical Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço a todos os docentes do mestrado, em especial à Professora Isabel Natário, pela orientação, disponibilidade e paciência.

Agradeço à Marta e à minha família, sem eles nada era possível.

Agradeço aos meus colegas de trabalho.

Resumo

Introdução: As infecções do trato urinário (ITU) afetam milhões de pessoas a nível mundial, condicionando morbidade e custos significativos para a sociedade. As resistências aos antibióticos são um problema global e de extrema importância, já que limitam as opções terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas. Adicionando complexidade, estão identificados fatores de risco (FR) para resistência antibiótica em infecções adquiridas na comunidade, sugerindo que para melhorar a probabilidade de sucesso terapêutico é necessário ter em conta determinadas características dos doentes, podendo mesmo ser determinante em situações graves como a pielonefrite aguda com gravidade que justifique internamento hospitalar.

Objetivos: Analisar a flora microbiana responsável por ITU e estudar o seu perfil de resistência antibiótica. Identificar FR para resistência aos antibióticos neste contexto. Pretende-se ainda, mediante as várias opções terapêuticas para a pielonefrite aguda com indicação para internamento, prever a probabilidade de sucesso terapêutico.

Métodos: Realizada uma análise retrospectiva dos resultados de estudos microbiológicos de urina (UC) efetuados no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Garcia de Orta. Os FR considerados foram: idade, género, residência em lar, diagnóstico de diabetes mellitus, portador crónico de cateter urinário, internamento nos últimos 30 dias, tratamento com antibiótico nos últimos 90 dias e identificação de agente multirresistente (MR) em UC no último ano. A partir dos dados obtidos, foram criados modelos de regressão logística multivariada. Os modelos foram sujeitos a processos de seleção de variáveis, avaliação de qualidade dos ajustamentos e análise de performance.

Resultados: A amostra final foi constituída por 1341 resultados positivos de UC. A idade média dos doentes correspondentes foi 62.6 anos com predomínio do sexo feminino (72.9%). Em 38.6% dos casos não apresentavam FR modificáveis, 40.3% tem apenas um FR e 21.1% têm mais que um FR. Verifica-se associação estatisticamente significativa entre o isolamento de uma bactéria MR em UC e a idade (escalões etários dos 65 aos 79 anos e maior ou igual a 80 anos, com *odds ratio* (OR) de 1.69 e 1.66 respetivamente), residência

em lar (OR 3.37), internamento nos últimos 30 dias (OR 1.71), tratamento com antibiótico nos últimos 90 dias (OR 3.43) e a identificação de agente MR em UC no último ano. Analisando os resultados dos modelos para cálculo das probabilidades preditas, verifica-se que o sexo masculino, a residência em lar, internamento nos últimos 90 dias, antibioterapia nos últimos 30 dias e isolamento de agente MR no último 1 ano, estão associados de forma consistente a maior risco de resistência antibiótica.

Conclusões: O nosso estudo permitiu identificar sub-populações de doentes com maior probabilidade de resistência aos antimicrobianos, nomeadamente: idade igual ou superior a 65 anos, sexo masculino, portadores de cateter urinário crónico, internamento nos últimos 30 dias, antibioterapia nos últimos 90 dias, isolamento de agente MR no último ano e residência em lar. Foi possível calcular as probabilidades preditas de sucesso terapêutico atendendo às características dos doentes, o que pode constituir uma ferramenta auxiliar de uma prescrição antibiótica adequada.

Palavras chave: Infecções do trato urinário; Fatores de risco; Resistência aos antibióticos; Tratamento empírico; Regressão logística.

Abstract

Introduction: Urinary tract infections (UTIs) affect millions of people globally, conditioning morbidity and significant costs to society. Resistance to antibiotics is a global problem of major importance to society, since it limits therapeutic options for the treatment of infectious diseases. Adding complexity, risk factors (RF) for antibiotic resistance in community-acquired infections have been identified, suggesting that in order to improve the probability of therapeutic success certain patient characteristics need to be taken into account and may even be critical in severe conditions such as severe acute pyelonephritis.

Objectives: Analyze the microbial flora responsible for UTI and study its antibiotic resistance profile. Identify RF for antibiotic resistance in this context. Predict the success probability of the various therapeutic options for acute pyelonephritis with indication for hospital admission.

Methods: A retrospective analysis of the results of urinary microbiological studies (UC) performed at the Laboratory of Microbiology of the Garcia de Orta Hospital. The RF considered were: age, gender, residence in nursing home, diabetes mellitus diagnosis, chronic urinary catheterization, hospitalization in the last 30 days, antibiotic treatment in the last 90 days and multiresistant (MR) agent identification in UC on previous year. From the data obtained, multivariate logistic regression models were created. The models were subjected to variable selection processes, quality assessment of the adjustments and performance analysis.

Results: The ultimate sample consisted of 1341 UC positive results. The mean age of the corresponding patients was 62.6 years with a predominance of females (72.9%). Of the cases, 38.6% had no modifiable RF, 40.3% had only one and 21.1% had more than one RF. There was a statistically significant association between isolation of MR bacteria in UC and age (age range 65 to 79 and more than 79, *odds ratio* (OR) of 1.69 and 1.66 respectively), nursing home residency (OR 3.37), hospitalization in the last 30 days (OR 1.71), antibiotic treatment in the last 90 days (OR 3.43) and MR agent identification in UC on the previous

year. Analyzing the results of the models for calculating the predicted probabilities, we observed that male sex, nursing home residency, hospitalization in the last 90 days, antibiotic therapy in the last 30 days and MR agent isolation in the last year, are consistently associated with higher risk for antibiotic resistance.

Conclusions: Our study allowed us to identify sub-populations of patients with a greater probability of antimicrobial resistance, namely: more than 64 years old, male, patients with chronic urinary catheterization, hospitalization in the last 30 days, antibiotic therapy in the last 90 days, MR agent isolation on the previous year and residency in nursing home. It was possible to calculate the predicted probabilities of therapeutic success, taking into account the characteristics of the patients, which may serve as an auxiliary tool to guide adequate antibiotic prescription.

Keywords: Urinary tract infection; Risk factors; Antibiotic resistance; Empiric treatment; Logistic regression.

Conteúdo

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	6
CONTEÚDO.....	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE GRÁFICOS E FLUXOGRAMAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS	12
CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
A. Definições	14
B. Epidemiologia	15
C. Agentes etiológicos	16
D. Resistências aos antimicrobianos	16
E. Motivo e objetivos do estudo de investigação	18
CAPITULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS	19
A. Dados e período do estudo.....	20
B. Métodos	21
i. Análise exploratória.....	21
ii. Modelos.....	21

iii. Estimação	24
iv. Seleção de covariáveis.....	27
v. Medidas de performance	27
vi. Interpretação de resultados	28
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS.....	29
CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO	45
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

Lista de tabelas

Tabela 1: Caracterização da amostra

Tabela 2: Agentes microbiológicos isolados

Tabela 3: Agentes microbiológicos isolados de acordo com escalões etários

Tabela 4: Agentes microbiológicos isolados de acordo com o género

Tabela 5: Bactérias isoladas de acordo com a presença ou ausência de fatores de risco para multirresistência

Tabela 6: Frequências de agentes multirresistentes em relação aos fatores de risco

Tabela 7: Probabilidade de sucesso de cada antibiótico

Tabela 8: Associação entre covariáveis e variável resposta multirresistente

Tabela 9: Resultados da análise multivariada do modelo 1.1

Tabela 10: Resultados da análise multivariada do modelo 2.1

Tabela 11: *Odds ratio* com respetivos intervalos de confiança e área abaixo da curva dos modelos multivariados 3 a 10

Tabela 12: Probabilidades preditas de sucesso da terapêutica antibiótica empírica

Tabela 13: Fatores de risco para isolamento de bactéria multirresistente

Tabela 14: Fatores de risco para isolamento de bactéria produtora de β -lactamases de largo espectro

Tabela 15: Proposta para terapêutica empírica

Lista de gráficos e fluxogramas

Fluxograma 1: Observações excluídas e amostra final

Gráfico 1: Curva ROC do modelo 1.1

Gráfico 2: Curva ROC do modelo 2.1

Lista de abreviaturas, siglas ou acrónimos

Ab - Antibiótico

AIC - *Akaike information criterion*

AUC - Área abaixo da curva

DDD - Dose diária definida

DGS - Direção geral de saúde

E. coli - *Escherichia coli*

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

EARS-Net - *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ESBL - β -lactamases de espectro alargado

Escalao - Escalões etários

F - Feminino

FR - Fatores de risco

Int - Internamento

ITU - Infecções do trato urinário

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

M - Masculino

MLG - Modelos lineares generalizados

MR - Multirresistente

MV - Máxima verosimilhança

OR - *Odds ratio*

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

P. mirabilis - *Proteus mirabilis*

RA - Resistência aos antibióticos

ROC - *Receiver Operating Characteristic*

S - Função *score*

UC - Urocultura ou culturas microbiológicas de urina



Capítulo 1

Fundamentação Teórica

A. Definições

As infecções do trato urinário (ITU) podem ser classificadas em bacteriúria assintomática, cistite e pielonefrite. Para este fim foram usadas as seguintes definições:

- Bacteriúria assintomática: Presença de bactérias na urina, quantificadas por uma contagem de colônias $\geq 10^5$ cfu/ml¹
- Cistite: Infecção localizada da bexiga que se manifesta por disúria, sensação de urgência com aumento da frequência urinária, dor hipogástrica e ausência de sintomas sistêmicos¹
- Pielonefrite aguda: Infecção renal que se manifesta por febre, dor no flanco, disúria, sensação de urgência com aumento da frequência urinária e dor hipogástrica¹
- Urosépsis: Sépsis de ponto de partida em ITU. Definindo-se sépsis com uma disfunção orgânica potencialmente fatal secundária a resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção¹⁶

As ITU podem ainda ser estratificadas como complicadas e não complicadas¹. A ITU não complicada é definida como a infecção em doentes com aparelho urinário estruturalmente normal. Definiu-se ITU complicada como a que surge na existência de fatores que aumentam o risco de infecção persistente ou recidivante, nomeadamente:

- Crianças e grávidas e no sexo masculino
- Existência de corpos estranhos como cateter urinário ou cálculos
- Obstrução do trato urinário
- Imunossupressão
- Insuficiência renal
- Transplante renal
- Retenção urinária por doença neurológica
- Infecção associada aos cuidados de saúde

As ITU foram ainda classificadas como adquiridas na comunidade ou no hospital¹.

B. Epidemiologia

As ITU afetam milhões de pessoas a nível mundial, condicionando morbidade e custos significativos para a sociedade². Dados dos Estados Unidos da América, reportam que estas infeções são motivo de 0.9% das consultas de ambulatório, 2 a 3 milhões de visitas ao Serviço de Urgência e são causa de mais de 100000 internamentos por ano^{2,3}. Em Portugal, é difícil precisar a sua prevalência na comunidade, no entanto, segundo o 2º inquérito europeu de prevalência de infeção realizado em 2017, as ITU são as infeções associadas aos cuidados de saúde mais frequentes⁴.

As ITU são mais frequentes no sexo feminino, estimando-se que até 60% das mulheres terão pelo menos um episódio de ITU sintomática durante a sua vida⁵. O pico de incidência ocorre em mulheres sexualmente ativas, entre os 18 e 24 anos. Estão identificados vários fatores de risco que contribuem para este excesso de incidência, nomeadamente: atividade sexual, utilização de diafragma (especialmente com espermicida) como método contraceptivo, não urinar após atividade sexual e episódios prévios de ITU. A incidência diminui após os 35 anos e volta a aumentar após os 65 anos^{1,5}.

As ITU no sexo masculino, habitualmente estão associadas a defeito estrutural do trato urinário. A homossexualidade e jovens não circuncidados têm um risco acrescido¹.

A partir dos 65 anos, existe uma aproximação na incidência de ITU entre géneros. A maior frequência de outras doenças neste escalão etário (por exemplo a doença prostática), podem explicar este aumento de incidência^{1,5}.

Estão ainda identificados outros fatores de risco para ITU^{1,5}, nomeadamente:

- Instrumentação do trato urinário
- Obstrução do trato urinário (incluindo por cálculo)
- Bexiga neurogénica
- Transplante renal
- Diabetes mellitus
- Alterações do estado mental em idosos

C. Agentes etiológicos

No global, com os dados em Portugal a serem concordantes, a infeção a *Escherichia coli* (*E. coli*) é a causa mais frequente de ITU adquirida na comunidade, seguido por infeções a *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) e *Enterococcus spp*⁶.

Relativamente às ITU adquiridas no hospital, existem mais variações relacionadas com o local de aquisição da infeção, condição clínica e a localização geográfica. Neste contexto, verifica-se uma elevada incidência de infeção a *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e em até 10% dos casos os agentes causais são bactérias raramente isoladas na comunidade^{5,7}.

D. Resistências aos antimicrobianos

As resistências aos antibióticos (RA), podem ser definidas como a capacidade de um microrganismo resistir a pelo menos um antibiótico⁹. No caso das bactérias, as resistências podem surgir por mutações nos seus genes ou por aquisição de material genético proveniente de outras bactérias⁹. A utilização inapropriada de antibióticos e a transmissão de bactérias entre humanos são as causas principais de aquisição e disseminação de resistências, condicionando uma multiplicidade de resistências combinadas aos antibióticos⁹. A unidade de medida do consumo de antibióticos, utilizada para fins epidemiológicos é a dose diária definida (DDD). Esta unidade é a dose média diária de manutenção de uma determinada substância ativa, por 1000 habitantes e por dia. Em 2017, a média europeia foi 21.4 DDD e em Portugal 20.3 DDD⁸. Verifica-se que o consumo de antibióticos é menor no norte da Europa onde também as RA são menores^{8,9}.

Particularmente relevante, é o aumento dramático de bactérias gram negativas produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL)^{9,13}. A produção destas enzimas, resulta por definição, em resistência aos antibióticos como as cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e aztreonam¹³. Existem vários sub-tipos de ESBL, conferindo resistência a múltiplos antibióticos, limitando as opções terapêuticas para doentes com infeções por estas bactérias²¹. O aumento de bactérias produtoras de ESBL resulta em aumento do consumo de carbapenemes, que por sua vez culmina em aumento de bactérias produtoras de enzimas que

inativam estes antibióticos (carbapenemas)⁹. Este ciclo vicioso, se não travado terá consequências graves nas opções terapêuticas para as infeções bacterianas.

O tema das RA, encontra-se entre os programas prioritários das organizações internacionais de saúde. A *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net), é um sistema de vigilância que monitoriza os padrões de RA de bactérias que têm potencial de causar infeções graves. Entre essas bactérias encontram-se a *Escherichia coli*, que é o principal agente causal das ITU, a *Klebsiella pneumoniae* (K. pneumoniae), que além ser um agente com relevância na comunidade, é particularmente importante em ambiente hospitalar e a *Pseudomonas aeruginosa*, que é um agente oportunista, mas também responsável por um número não desprezível de ITU na comunidade⁶. Dados provenientes deste sistema de vigilância, mostram incidência elevada de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (principalmente a *Klebsiella pneumoniae*) e resistências a antibióticos chave⁹. Dados relativos a 2017, mostram que em Portugal, a E. Coli é resistente a cefalosporinas de 3ª geração em 15.6%, notando-se uma ligeira diminuição comparativamente a 2014 (16.4%), sendo este número abaixo da média da União Europeia. Em relação à K. pneumoniae, é resistente a este grupo de antibióticos em 44.9%, verifica-se um aumento de 4% relativamente a 2014, sendo este número acima da média da União Europeia (31.2%)⁹.

Atendendo à elevada prevalência das ITU, será lógico admitir que são motivo frequente de prescrição antibiótica, estando relatadas elevadas taxas de falência da terapêutica empírica¹⁰. Verifica-se ainda que o número de internamentos por ITU, está a aumentar também por ausência de opções de tratamento em ambulatório³. Adicionando complexidade, estão descritas características que conferem um risco aumentado de resistência aos antibióticos, nomeadamente: sexo masculino, idade (escalões etários mais elevados), realização de antibioterapia nos últimos 90 dias, internamento em hospital nos últimos 30 dias, residência em lar, cateter urinário crónico, imunossupressão farmacológica, diagnóstico de diabetes mellitus e isolamento em urocultura (UC) de bactéria multirresistente (MR) no último ano¹¹,¹⁹. Estão ainda identificadas variações geográficas no perfil de resistência aos antibióticos. Um estudo realizado em Espanha, onde foram analisados os resultados de UC de 9 comunidades autónomas, Antónia Andreu e colegas relataram que a frequência relativa dos agentes microbiológicos era semelhante entre regiões, mas os perfis de sensibilidade era muito variável¹².

E. Motivo e objetivos do estudo de investigação

A necessidade de internamento para tratamento de ITU pode ser devida à gravidade da doença (por exemplo com sépsis associada), existência de comorbidades significativas, ou por falência da terapêutica antibiótica empírica secundária a RA e necessidade de terapêutica com antibióticos só passíveis de serem administrados em meio hospitalar. No primeiro caso, a falência da terapêutica antibiótica empírica pode ter impacto negativo no prognóstico do doente, pelo que é fundamental conhecer a flora microbiológica local e conhecer os fatores de risco da RA de forma a melhorar a probabilidade de sucesso da antibioterapia empírica.

Os objetivos do estudo de investigação são:

- 1- Estudar o perfil microbiológico das ITU adquiridas na comunidade:
 - a. Taxa de agentes MR, incluindo taxa de bactérias produtoras de ESBL.
 - b. Taxa de resistência a cada antibiótico estudado.

- 2- Formular modelo estatístico que permita:
 - a. Identificar fatores de risco para MR, inclusive para bactérias produtoras de ESBL.
 - b. Predizer a probabilidade de sucesso terapêutico, permitindo definir qual o melhor antibiótico para terapêutica empírica da pielonefrite adquirida na comunidade, em adultos e com necessidade de internamento. Pretende-se individualizar a antibioterapia empírica desta patologia, aumentando a probabilidade de sucesso terapêutico, se possível utilizando antibióticos com menor espectro de ação, minimizando a ocorrência de resistências.



Capitulo 2

Material e Métodos

A. Dados e período do estudo

Para realização do estudo foram recolhidos os resultados das culturas microbiológicas de urina (UC) positivas, realizadas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Garcia de Orta, entre Janeiro e Outubro de 2018. Estes dados encontram-se armazenados em base de dados do Serviço de Patologia Clínica. Neles constam o número do processo clínico do doente em que o resultado do exame foi positivo, os microrganismos identificados e o seu perfil de resistência aos antibióticos. Serão analisados os perfis de resistência aos antibióticos que constam do formulário hospitalar, e que são indicados para o tratamento de pielonefrite aguda no adulto com necessidade de internamento, nomeadamente: amoxicilina com clavulanato, piperacilina com tazobactam, cefuroxime, ceftriaxone, meropenem, gentamicina, aztreonam e ciprofloxacina. Os agentes microbianos serão classificados como MR de acordo com os critérios descritos na literatura¹⁴.

Através do número do processo clínico foi possível pesquisar a presença ou ausência dos possíveis fatores de risco para RA em estudo, nomeadamente:

- Sexo
- Idade
- Realização de antibioterapia nos últimos 90 dias
- Internamento em hospital, com duração superior a 48h, nos últimos 30 dias
- Residência em lar
- Cateter urinário crónico (> 3 meses)
- Imunossupressão farmacológica
- Diagnóstico de diabetes mellitus
- Isolamento em UC de bactéria multirresistente no ultimo ano

Estes dados foram obtidos a partir da base de dados hospitalar Sclinico e do Registo de Saúde Eletrónico.

O estudo foi autorizado pela Comissão de Ética e Conselho de Administração do Hospital Garcia de Orta.

Foram considerados os seguintes critérios de exclusão:

- < 18 anos.
- Ausência de informação adequada nos sistemas de registo dos doentes.
- UC colhida com > 72h de internamento, excluindo infeção adquirida no hospital.
- Infeção persistente, definida como o isolamento do mesmo agente com igual perfil de sensibilidade aos antibióticos em 2 UC com < 1 mês de intervalo, evitando duplicação de dados.
- Isolamento de fungos.

Para análise dos dados, será utilizado o software R (<https://www.R-project.org/>).

B. Métodos

i. Análise exploratória

Foi realizada uma análise preliminar dos dados, em que foram calculadas as frequências absolutas e relativas das variáveis estudadas.

ii. Modelos

Os modelos lineares generalizados (MLG) pressupõem que a variável resposta tenha uma distribuição pertencente à família exponencial de distribuições^{15,16}. Adicionalmente, estabelecem uma relação linear entre a média da variável resposta e potenciais fatores de risco.

A equação que estabelece essa ligação para determinada variável resposta Y , através da sua média $E[Y]$, é a seguinte:

$$g[E(Y)] = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p$$

Em que g é uma função conhecida, denominada função de ligação, x_j são variáveis independentes e β_j são constantes reais e considerados os parâmetros do modelo.

Os MLG incluem os modelos de regressão logística¹⁵. Estes modelos são utilizados quando se pretende modelar variáveis resposta de natureza binária, à custa das covariáveis x , tomando valores de 0 ou 1:

$P(Y = 1) = \pi(x)$, probabilidade de sucesso

$P(Y = 0) = 1 - \pi(x)$, probabilidade de insucesso

Então, $E(Y)$ varia no intervalo entre $[0,1]$. Temos:

$$E(Y) = \pi(x)$$

Escolhe-se então como função de ligação a função logit, que relaciona $E[Y]$ com possíveis fatores de risco:

$$g[\pi(x)] = \ln\left[\frac{\pi(x)}{1 - \pi(x)}\right] = \beta_0 + \sum_j^p \beta_j x_j$$

O modelo de regressão logística pode ser univariado ou multivariado, sendo o primeiro constituído apenas por uma variável explicativa e o segundo, que é uma generalização do primeiro, por mais que uma variável explicativa. Ficam então determinados por (sendo x escalar ou vetorial dependendo do contexto):

- Modelo univariado:

$$\pi(x) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 x}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x}}$$

- Modelo multivariado:

$$\pi(x) = \frac{e^{\beta_0 + \sum_j^p \beta_j x_j}}{1 + e^{\beta_0 + \sum_j^p \beta_j x_j}} \quad (1)$$

Na sequência da análise preliminar aos dados, analisa-se a associação entre as variáveis resposta e os potenciais fatores de risco em estudo. Para tal foi utilizada a modelação logística univariada.

Posteriormente foram considerados vários modelos de regressão logística multivariada, em que foram utilizadas as seguintes variáveis resposta de natureza binária:

1) Modelos para avaliação dos fatores de risco para multirresistência:

- Modelo 1 - Variável Multiresistente - Bactéria isolada é MR aos antibióticos (0 = não e 1 = sim)
- Modelo 2 - Variável ESBL - Bactéria isolada é produtora ESBL (0 = não e 1 = sim)

2) Modelos para avaliação da sensibilidade a um antibiótico em particular, levando em consideração os critérios de RA:

- Modelo 3 - Variável (Amoxicilina+clavulanato) - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)
- Modelo 4 - Variável Cefuroxime - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)
- Modelo 5 - Variável Ceftriaxone - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)
- Modelo 6 - Variável (Piperacilina+Tazobactam) - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)
- Modelo 7 - Variável Meropenem - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)
- Modelo 8 - Variável Gentamicina - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)
- Modelo 9 - Variável Aztreonam - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)
- Modelo 10 - Variável Ciprofloxacina - Bactéria isolada sensível ou resistente ao antibiótico (0 = resistente e 1 = sensível)

As variáveis explicativas consideradas foram a idade, a única quantitativa e que posteriormente foi transformada em qualitativa ordinal, criando-se assim 4 escalões etários (escalão). As variáveis explicativas qualitativas são:

- Escalão (1 = 18 - 40 anos, 2 = 41 - 64 anos, 3 = 65 - 79 anos, 4 = \geq 80 anos)
- Sexo (0 = feminino e 1 = masculino)
- Antibioterapia - Se a pessoa em que foi identificada a bactéria realizou antibioterapia nos 90 dias prévios ao isolamento (0 = não e 1 = sim)
- Internamento - Se a pessoa em que foi identificada a bactéria esteve internada mais que 48h nos 30 dias prévios ao isolamento (0 = não e 1 = sim)
- Cateter - Se a pessoa em que foi identificada a bactéria é portadora crónica de cateter urinário na altura do isolamento (0 = não e 1 = sim)
- Lar - Se a pessoa em que foi identificada a bactéria reside em lar (0 = não e 1 = sim)
- Imuno - Se a pessoa em que foi identificada a bactéria encontrava-se imunodeprimida por causa farmacológica (0 = não e 1 = sim)
- Diabetes - Se a pessoa em que foi identificada a bactéria tinha o diagnóstico de diabetes (0 = não e 1 = sim)
- MR prévio - Se a pessoa em que foi identificada a bactéria, teve isolamento de bactéria MR na urina, no ano prévio ao isolamento atual (0 = não e 1 = sim)

iii. Estimação

A estimação de parâmetros dos modelos é feita por máxima verosimilhança (MV), usando o método dos mínimos quadrados ponderados, baseado no método dos scores de Fisher. De uma forma geral, os parâmetros estimados correspondem aos valores que maximizam a plausibilidade de obter os dados observados.

Tendo a variável resposta para a i -ésima observação Y_i uma distribuição Bernoulli, a sua função de probabilidade é:

$$f_i(y_i) = \pi_i^{y_i} (1 - \pi_i)^{1-y_i}, y_i = 0, 1, i = 1, \dots, n$$

Sendo a dependência dos π_i nos coeficientes de regressão $\boldsymbol{\beta} = (\beta_1, \dots, \beta_p)$ feita através da função ligação como descrito anteriormente, a função MV é dada por:

$$L_y(\boldsymbol{\beta}) = \prod_{i=1}^n \pi_i^{y_i} (1 - \pi_i)^{1-y_i}$$

A função pode ser simplificada pela sua logaritmização, sendo que a função Log-verosimilhança é a seguinte:

$$\begin{aligned} l_y(\boldsymbol{\beta}) &= \log \left(\prod_{i=1}^n \pi_i^{y_i} (1 - \pi_i)^{1-y_i} \right) \\ &= \sum_{i=1}^n y_i \log \left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i} \right) + \sum_{i=1}^n \log(1 - \pi_i) = \text{(por (1))} \\ &= \sum_{i=1}^n [y_i(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip}) - \log(1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip})})] \end{aligned}$$

A estimativa dos parâmetros $\boldsymbol{\beta} (\hat{\boldsymbol{\beta}})$, é obtida através da função score (S), que corresponde à derivada da função Log-verosimilhança em relação a todos os $\boldsymbol{\beta}$, e posteriormente igualada a 0:

$$S(\boldsymbol{\beta}) = l'_y(\boldsymbol{\beta}) = 0$$

$$= \begin{cases} \sum_{i=1}^n \left(y_i - \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip})}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip})}} \right) = 0 \\ \sum_{i=1}^n x_{i1} \left(y_i - \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip})}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip})}} \right) = 0 \\ \vdots \\ \sum_{i=1}^n x_{ip} \left(y_i - \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip})}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip})}} \right) = 0 \end{cases}$$

A resolução destas formulas é conseguido numericamente através de métodos iterativos que se encontram implementados na função "glm" no software R.

Após estimação de parâmetros, o passo seguinte é determinar a significância das covariáveis para o modelo. Para tal realizamos um teste de hipóteses:

$$H_0: \beta_j = 0$$

$$H_1: \beta_j \neq 0$$

recorrendo à estatística de Wald, para todos os coeficientes em simultâneo:

$$(\hat{\beta} - \beta)^T I(\beta)(\hat{\beta} - \beta) \sim \chi^2_{(k)}, \text{ em que:}$$

k é o número total de parâmetros,

I é a matriz de informação de Fisher, de elementos I_{ij} ; ou para um coeficiente de cada vez:

$$(\hat{\beta}_i - \beta_i)^2 I_{ii}(\beta) \sim \chi^2_{(1)}$$

No estudo em questão, será utilizado um nível de significância de 0.05.

Depois da estimação de parâmetros e determinação da sua significância, é fundamental avaliar a qualidade do ajustamento. Tal é possível, através de um teste de razão de verosimilhanças, que compara os resultados observados com os preditos, usando o desvio:

$$D = -2 \log \left[\frac{\text{verosimilhança do modelo ajustado}}{\text{verosimilhança do modelo saturado}} \right]$$

Define o modelo saturado, como aquele em que o número de parâmetros é igual ao número de observações, atribuindo toda a variação dos dados à componente sistemática dos modelos. Não se conhece a distribuição do desvio, pelo que utiliza-se uma distribuição aproximada do $\chi^2_{(n-k)}$, em que k é o número de parâmetros e n o número de observações¹⁶. Coloca-se então a hipótese nula do modelo se ajustar aos dados.

iv. Seleção de covariáveis

O objetivo da seleção de covariáveis está em tornar o modelo logístico multivariado o mais parcimonioso, ou seja, que explique os dados com o menor número de covariáveis. O primeiro passo na seleção, é considerar modelos univariados com cada uma das covariáveis, sendo selecionadas as clinicamente relevantes e com $p\text{-value} < 0.25$ ¹⁵.

Para seleção de covariáveis no modelo multivariado, será utilizada a função *step* do software *R*. Este processo de exclusão de covariáveis, tem em consideração o valor do critério de informação de Akaike (AIC), que de uma forma geral é uma medida de qualidade do ajustamento. Este critério de informação, é baseado na função log-verosimilhança com um fator de penalização da complexidade do modelo. Valores menores de AIC correspondem a melhores modelos^{15,16}.

v. Medidas de performance

A análise ROC (Receiver Operating Characteristic) é vastamente utilizada na Medicina para avaliação de testes de diagnóstico. Permite avaliar a sensibilidade e especificidade de um determinado teste de diagnóstico, para diferentes pontos de corte²². Na prática, traduz-se em uma representação gráfica da sensibilidade (proporção de verdadeiros positivos) e 1-especificidade (proporção de verdadeiros negativos), resultantes da variação do valor de ponto de corte, estando a primeira no eixo das ordenadas e a segunda no eixo das abcissas. A área abaixo da curva (AUC) é um dos indicadores da qualidade das curvas ROC, avaliando a capacidade de um modelo discriminar entre indivíduos que experienciam o acontecimento em estudo dos que não. O seu valor oscila entre 0 e 1, em que quanto mais perto do 1, maior o número de verdadeiros positivos e menor o número de falsos negativos vamos ter¹⁵. Utiliza-se o seguinte critério para classificar os modelos¹⁵:

- $AUC = 0.5$: Sem capacidade discriminatória
- $0.6 \leq AUC < 0.7$: Capacidade discriminatória limitada
- $0.7 \leq AUC < 0.8$: Capacidade discriminatória aceitável
- $0.8 \leq AUC < 0.9$: Capacidade discriminatória excelente
- $AUC \geq 0.9$: Capacidade discriminatória excepcional

vi. Interpretação de resultados

O *Odds Ratio* (OR) é uma medida de associação, que permite estimar a relação entre variáveis binárias. É dado pelo quociente entre a probabilidade de o acontecimento de interesse ocorrer em indivíduos com e sem determinada característica.

A fórmula de cálculo de OR associada a um modelo de regressão logística multivariado com covariável binária x_j é a seguinte:

$$\begin{aligned} OR &= \frac{\frac{\pi(1)}{1 - \pi(1)}}{\frac{\pi(0)}{1 - \pi(0)}} = \\ &= \frac{e^{\beta_0 + \beta_j + \sum_{k \neq j}^p \beta_k x_k}}{e^{\beta_0 + \sum_{k \neq j}^p \beta_k x_k}} = \\ &= e^{\beta_j} \end{aligned}$$

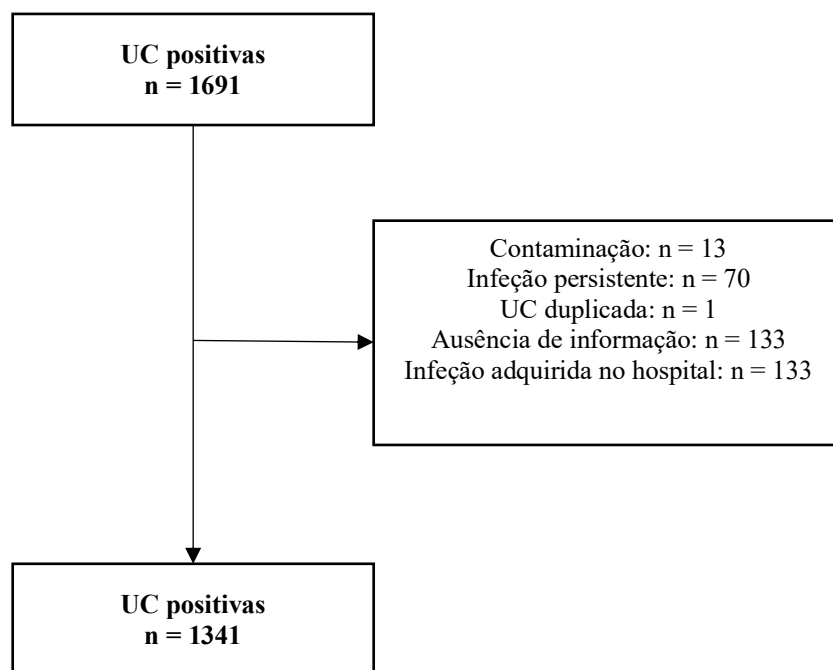
Esta medida vai permitir quantificar a associação entre os hipotéticos fatores de risco para RA e a presença de bactérias MR, produtoras de ESBL e sensibilidade aos antibióticos.



Capítulo 3

Resultados

Considerando os critérios de elegibilidade para o estudo, a amostra inicial continha 1691 resultados positivos de UC, dos quais 350 foram excluídos pelos motivos expressos no Fluxograma 1, ficando a amostra final para estudo com 1341 resultados positivos de UC.



Fluxograma 1 - Observações excluídas e amostra final

A idade média dos doentes foi 62.6 anos, com desvio padrão de 20.48 e mediana de 68 anos. Na Tabela 1, é realizada uma caracterização da amostra, relativamente aos fatores de risco para RA. O escalão etário mais representativo, foi entre os 65 e 79 anos (31.7%). Houve predominância do sexo feminino (72.9%). Em 38.6% dos casos não apresentavam fatores de risco (FR) modificáveis para RA, 40.3% tem apenas 1 FR e 21.1% têm > 1 FR. As características estudadas mais prevalentes foram a antibioterapia ≤ 90 dias (36.7%), diabetes mellitus (16%) e a imunossupressão farmacológica (13.1%).

Fatores de risco para RA	n
Escalão etário	
18 - 40 anos	286 (21.3%)
41 - 64 anos	303 (22.6%)
65 - 79 anos	425 (31.7%)
≥ 80 anos	327 (24.4%)
Sexo	
Feminino	978 (72.9%)
Masculino	363 (26.1%)
Ausência de fatores de risco	517 (38.6%)
1 FR	540 (40.3%)
2 FR	219 (16.3%)
3 FR	55 (4.1%)
> 3 FR	10 (0.7%)
Lar	102 (7.6%)
Internamento ≤ 30 dias	83 (6.2%)
Antibioterapia ≤ 90 dias	492 (36.7%)
Cateter urinário crónico	73 (5.4%)
Diabetes mellitus	214 (16%)
Imunossupressão farmacológica	176 (13.1%)
Isolamento de agente MR ≤ 1 ano	44 (3.3%)

Tabela 1 - Caracterização da amostra

Na Tabela 2 estão descritos os agentes microbiológicos isolados nas UC, com frequência relativa $\geq 1\%$.

Agentes microbiológicos	n	MR	ESBL
<i>Escherichia coli</i>	866 (64.6%)	215 (24.8%)	93 (10.7%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	159 (11.9%)	47 (29.6%)	36 (22.6%)
<i>Proteus mirabilis</i>	76 (5.7%)	5 (6.6%)	2 (2.6%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 (3.7%)	11 (22%)	7 (14%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	46 (3.4%)	1 (2.2%)	-
<i>Morganella morganii</i>	22 (1.6%)	2 (9.1%)	2 (9.1%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	15 (1.1%)	6 (40%)	6 (40%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	14 (1%)	0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	14 (1%)	6 (42.9%)	-

Tabela 2: Agentes microbiológicos isolados

Os 5 primeiros agentes, correspondem a 89% dos microrganismos isolados. A *Escherichia coli* é o agente mais frequente (64.6%), seguido da *Klebsiella pneumoniae* (11.9%), *Proteus mirabilis* (5.7%), *Pseudomonas aeruginosa* (3.7%) e *Enterococcus faecalis* (3.4%). As restantes bactérias são identificadas em $< 2\%$ dos casos.

Dos microrganismos identificados, 22.3% eram MR e 12.1% dos agentes gram negativos eram ESBL. Em relação aos agentes mais frequentes:

- *Escherichia coli* é MR 24.8% e ESBL em 10.7%
- *Klebsiella pneumoniae* é MR em 29.6% e ESBL em 22.6%
- *Proteus mirabilis* é MR em 6.6% e ESBL em 2.6%

Analisando os agentes identificados de acordo com o escalão etário (Tabela 3), verifica-se a frequência relativa da *Escherichia coli* diminuir, enquanto a *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* aumentam com a idade.

	E. coli	K. pneumoniae	P. mirabilis	P. aeruginosa	E. faecalis
18 - 40 anos	197 (68.9%)	31 (10.8%)	15 (5.2%)	1 (0.3%)	11 (3.8%)
41 - 64 anos	227 (74.9%)	30 (9.9%)	18 (5.9%)	7 (2.3%)	4 (1.3%)
65 - 79 anos	266 (62.6%)	50 (11.8%)	22 (5.2%)	21 (4.9%)	16 (3.8%)
≥ 80 anos	184 (56.3%)	48 (14.7%)	21 (6.4%)	21 (6.4%)	15 (4.6%)

Tabela 3: Agentes microbiológicos isolados de acordo com escalões etários

Relativamente ao género, verifica-se que a *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* são mais frequentes no sexo feminino, enquanto que a *Pseudomonas aeruginosa* é mais frequentemente isolada no sexo masculino (Tabela 4).

	Masculino	Feminino
<i>Escherichia coli</i>	175 (48.2%)	691 (70.6%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	47 (12.9%)	112 (11.4%)
<i>Proteus mirabilis</i>	19 (5.2%)	57 (5.8%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31 (8.5%)	19 (1.9%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	23 (6.3%)	23 (2.3%)

Tabela 4: Agentes microbiológicos isolados de acordo com o género

Em relação aos outros fatores de risco estudados, verifica-se que quando presentes é menos provável o isolamento da *Escherichia coli*. Pelo contrário, a *Klebsiella pneumoniae* e a *Pseudomonas aeruginosa*, são isolados com mais frequência quando as mesmas características estão presentes (Tabela 5).

	E. coli	K. pneumoniae	P. mirabilis	P. aeruginosa	E. faecalis
Lar	63 (61.7%)	15 (14.7%)	8 (7.8%)	6 (5.8%)	0
Cateter urinário	23 (31.5%)	9 (12.3%)	6 (8.2%)	17 (23.2%)	3 (4.1%)
Int ≤ 30 dias	39 (46.9%)	23 (27.7%)	6 (7.2%)	4 (4.8%)	2 (2.4%)
Ab ≤ 90 dias	279 (56.7%)	71 (14.4%)	26 (5.3%)	33 (6.7%)	14 (2.8%)
MR prévio	18 (40.9%)	13 (29.5%)	1 (2.2%)	3 (6.8%)	0
Diabetes	131 (61.2%)	34 (15.8%)	3 (1.4%)	13 (6%)	4 (1.8%)
Imunossupressão	117 (66.4%)	25 (14.7%)	8 (4.5%)	3 (1.7%)	5 (2.8%)
Sem FR	387 (74.8%)	41 (7.9%)	37 (7.1%)	4 (0.8%)	24 (4.6%)

Tabela 5: Bactérias isoladas de acordo com a presença ou ausência de fatores de risco para MR

Na Tabela 6, estão descritas as frequências absoluta e relativa de agentes MR em relação aos fatores de risco estudados:

Fatores de risco	Agente MR
Escalão etário	
18 - 40 anos	40 (13.9%)
41 - 64 anos	57 (18.8%)
65 - 79 anos	104 (25.4%)
≥ 80 anos	98 (28.7%)
Sexo	
Feminino	196 (20%)
Masculino	103 (28.3%)
Residência em lar	
Sim	102 (47%)
Não	1239 (20.2%)
Internamento ≤ 30 dias	
Sim	83 (39.7%)
Não	1258 (21.1%)
Antibioterapia ≤ 90 dias	
Sim	492 (50.7%)
Não	849 (13.7%)
Cateter urinário crônico	
Sim	73 (34.2%)
Não	1268 (21.6%)
Diabetes mellitus	
Sim	214 (26.6%)
Não	1127 (20.7%)
Imunossupressão farmacológica	
Sim	176 (26.1%)
Não	1165 (22%)
Isolamento de agente MR ≤ 1 ano	
Sim	44 (70.4%)
Não	1297 (20.6%)

Tabela 6: frequências de agentes MR em relação aos fatores de risco

A frequência relativa de agentes MR aumenta com o escalão etário. Verifica-se ainda que este perfil de bactérias é mais frequente no sexo masculino e quando presentes todas as outras características estudadas, sendo mais notório nos casos em que os doentes residem em lar, realizaram antibiótico ≤ 90 dias, estiveram internados ≤ 30 dias ou tiveram um isolamento em UC de uma agente MR no último ano.

A Tabela 7, indicia, com base na amostra, a probabilidade de sucesso terapêutica de cada antibiótico:

Antibióticos	Sucesso terapêutico
Amoxicilina + clavulanato	968 (72.1%)
Cefuroxime	1052 (78.4%)
Ceftriaxone	1092 (81.4%)
Piperacilina + Tazobactam	1114 (83%)
Gentamicina	1175 (87%)
Ciprofloxacina	1082 (80.6%)
Aztreonam	1103 (82.2%)
Meropenem	1325 (98.8%)

Tabela 7: Probabilidade estimada de sucesso de cada antibiótico

Foi realizada uma análise exploratória para analisar a associação entre cada um dos fatores de risco para RA e a variável resposta MR. Esta associação foi estudada através da modelação logística univariada. Os resultados estão descritos na Tabela 8:

Fatores de risco	OR(IC95%)	p-value
Escalão etário		
18 - 40 anos	Classe de referência	
41 - 64 anos	1.42 (0.91 - 2.21)	0.11
65 - 79 anos	2.09 (1.40 - 3.12)	0.00
≥ 80 anos	2.48 (1.64 - 3.74)	0.00
Sexo		
Feminino	Classe de referência	
Masculino	1.58 (1.19 - 2.08)	0.00
Lar		
Não	Classe de referência	
Sim	3.49 (2.31 - 5.28)	0.00
Internamento ≤ 30 dias		
Não	Classe de referência	
Sim	2.46 (1.55 - 3.89)	0.00
Antibioterapia ≤ 90 dias		
Não	Classe de referência	
Sim	3.67 (2.81- 4.79)	0.00
Cateter urinário crónico		
Não	Classe de referência	
Sim	1.88 (1.14 - 3.12)	0.01
Diabetes mellitus		
Não	Classe de referência	
Sim	1.32 (0.94 - 1.85)	0.09
Imunossupressão farmacológica		
Não	Classe de referência	
Sim	1.27 (0.88 - 1.83)	0.19
Isolamento de agente MR ≤ 1 ano		
Não	Classe de referência	
Sim	9.15 (4.72 - 17.74)	0.00

Tabela 8: Associação entre covariáveis e variável resposta MR

A análise univariada confirma a associação estatisticamente significativa entre a identificação de agente MR em UC e a idade, escalões etários ≥ 65 anos, sexo masculino, residência em lar, o internamento ≤ 30 dias, a realização de antibioterapia ≤ 90 dias, a presença de catéter urinário crónico e isolamento de agente MR em UC no último ano.

De seguida foi criado o modelo de regressão logística multivariado (modelo 1) cuja variável resposta é a variável binária que reporta se houve identificação de uma bactéria MR em UC. Foram seguidos os seguintes passos:

1. Inclusão de todas as covariáveis estudadas na análise univariada. Após aplicação da função "step" do software R, foram eliminadas as covariáveis diabetes mellitus e imunossupressão farmacológica. Sugeria-se também a eliminação da covariável cateter, no entanto, atendendo a relevância clínica decidiu-se mantê-la no modelo (modelo 1.1).
2. Foi analisada a qualidade do modelo 1.1 através do teste da razão de verossimilhanças. O p-value do teste foi 0.961, concluindo-se que o ajuste é bom.
3. Foi analisada a capacidade discriminatória do modelo 1.1 através das curvas ROC (gráfico 1):

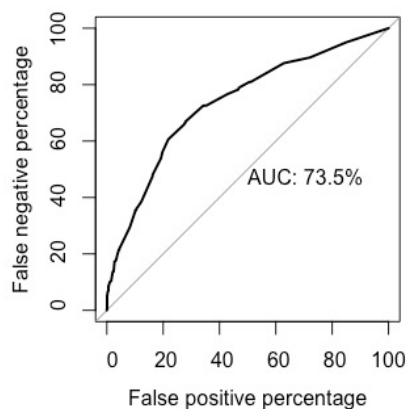


Gráfico 1 - Curva ROC do modelo 1.1

Verifica-se que a capacidade discriminatória do modelo é razoável (AUC 73.5%).

Os resultados do modelo de regressão logística multivariado estão descritos na Tabela 9:

	OR(IC95%)	p-value
Escalão etário		
18 - 40 anos	Classe de referência	
41 - 64 anos	1.27 (0.79- 2.04)	0.30
65 - 79 anos	1.69 (1.08 - 2.63)	0.01
≥ 80 anos	1.66 (1.04 - 2.65)	0.03
Sexo		
Feminino	Classe de referência	
Masculino	1.31 (0.94 - 1.81)	0.09
Internamento ≤ 30 dias		
Não	Classe de referência	
Sim	1.72 (1.03 - 2.84)	0.03
Antibioterapia ≤ 90 dias		
Não	Classe de referência	
Sim	3.43 (2.58 - 4.56)	0.00
Lar		
Não	Classe de referência	
Sim	3.37 (2.10 - 5.42)	0.00
Isolamento de MR ≤ 1 ano		
Não	Classe de referência	
Sim	6.24 (3.09 - 12.61)	0.00
Cateter urinário crônico		
Não	Classe de referência	
Sim	1.28 (0.73 - 2.25)	0.38

Tabela 9: Resultados da análise multivariada do modelo 1.1

Confirma-se os resultados da análise preliminar relativamente aos escalões etários. Tendo como classe de referência escalão etário dos 18 aos 40 anos, o escalão etário dos 41 aos 64 anos não está associado a risco aumentado. Já os escalões etários dos 65 aos 79 e ≥ 80 anos têm risco aumentado de isolamento em UC de agente MR quando comparado com a classe de referência, com um risco significativo de 1.69 e 1.66 vezes superior, respetivamente. O risco de isolamento de agente MR é maior em doentes que residem em lar (OR 3.37),

estiveram internados nos últimos 30 dias (OR 1.71), efetuaram antibioterapia nos últimos 90 dias (OR 3.43) e que tiveram isolamento de uma bactéria MR no ano anterior (OR 6.24). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre géneros e quando o cateter urinário crónico está presente ou não.

Aplicando a mesma metodologia do modelo anterior (modelo 1 e que resultou no modelo 1.1), foi criado novo modelo cuja variável resposta foi o isolamento de bactéria produtora de ESBL (modelo 2). O modelo final obtido pelos procedimentos step do R (modelo 2.1), compreende as mesmas covariáveis do modelo 1.1. A qualidade do ajustamento do modelo final foi boa (p-value 0.831) e com a sua capacidade discriminatória excelente (Gráfico 2), traduzido por AUC de 80.8%.

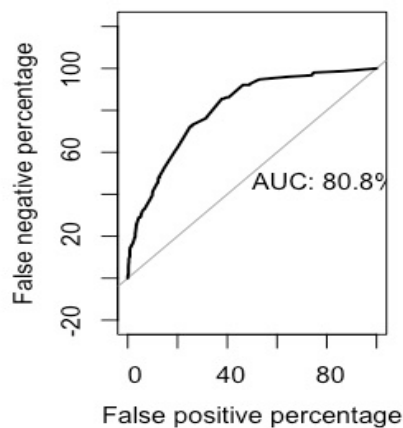


Gráfico 2 - Curva ROC do modelo 2.1

Os resultados do modelo 2.1 estão descritos na Tabela 10:

	OR(IC95%)	p-value
Escalão etário		
18 - 40 anos	Classe de referência	
41 - 64 anos	1.15 (0.72- 1.86)	0.54
65 - 79 anos	1.69 (1.00 - 2.46)	0.04
≥ 80 anos	1.66 (0.95 - 2.46)	0.07
Sexo		
Feminino	Classe de referência	
Masculino	1.41 (1.01 - 1.97)	0.03
Internamento ≤ 30 dias		
Não	Classe de referência	
Sim	1.57 (0.93- 2.65)	0.08
Antibioterapia ≤ 90 dias		
Não	Classe de referência	
Sim	3.43 (2.38- 4.23)	0.00
Lar		
Não	Classe de referência	
Sim	3.21 (1.99 - 5.19)	0.00
Isolamento de MR ≤ 1 ano		
Não	Classe de referência	
Sim	6.84 (3.26 - 14.33)	0.00
Cateter urinário crónico		
Não	Classe de referência	
Sim	1.28 (0.71 - 2.30)	0.40

Tabela 10 - Resultados da análise multivariada do modelo 2.1

Tal como no modelo prévio, os fatores associados a maior risco de isolamento de bactéria produtora de ESBL, são a residência em lar, a realização de antibioterapia nos últimos 90 dias e o isolamento de bactéria MR no último ano, com OR significativos de 3.21, 3.43 e 6.84, respetivamente. Neste modelo o sexo masculino associou-se a OR significativo de 1.41.

O passo seguinte foi o cálculo das probabilidades preditas de sucesso da terapêutica empírica para cada antibiótico disponível. Para tal, foram criados modelos de regressão logística multivariada, já especificados previamente (Modelos 3 a 10). Foram utilizadas as mesmas covariáveis do modelo 1.1.

Na tabela 11, estão descritos OR com respetivos IC e AUC dos modelos:

41 - 64 anos	66 - 79 anos	≥ 80 anos	Sexo Masc	Lar	Cateter Urinário	Int ≤ 30 dias	Ab ≤ 90 dias	MR ≤ 1 ano	AUC (%)
Amoxicilina + Clavulanato									
0.70 0.45-1.1	0.57 0.37-0.87	0.55 0.35-0.86	0.51 0.38-0.70	0.24 0.15-0.40	0.55 0.33-0.91	0.24 0.18-0.31	0.24 0.18-0.31	0.20 0.10-0.43	76.6
Cefuroxime									
1.15 0.68-1.92	0.67 0.42-1.07	0.65 0.40-1.06	0.33 0.24-0.46	0.33 0.20-0.54	0.44 0.24-0.46	0.47 0.28-0.79	0.31 0.23-0.48	0.19 0.09-0.38	77.1
Ceftriaxone									
1.28 0.74-2.21	0.81 0.49-1.33	0.69 0.41-1.14	0.34 0.24-0.48	0.36 0.21-0.60	0.41 0.24-0.71	0.43 0.25-0.73	0.28 0.21-0.39	0.17 0.08-0.34	78.5
Piperacilina + Tazobactam									
1.09 0.62-1.88	0.82 0.49-1.36	0.67 0.4-1.14	0.53 0.37-0.76	0.22 0.13-0.37	0.73 0.4-1.32	0.49 0.28-0.83	0.24 0.17-0.33	0.14 0.06-0.28	77.8
Gentamicina									
1.09 0.62-1.88	0.82 0.49-1.36	0.67 0.4-1.14	0.53 0.37-0.76	0.22 0.13-0.37	0.73 0.40-1.32	0.49 0.28-0.83	0.24 0.17-0.33	0.14 0.06-0.28	68.9
Ciprofloxacina									
0.68 0.4-1.14	0.5 0.31-0.81	0.52 0.31-0.87	0.62 0.44-0.86	0.29 0.18-0.47	0.92 0.52-1.66	0.56 0.33-0.94	0.37 0.28-0.5	0.23 0.11-0.44	73
Aztreonam									
2.26 1.37-3.74	1.55 0.99-2.42	1.31 0.82-2.08	0.37 0.26-0.52	0.4 0.24-0.68	0.85 0.47-1.52	0.5 0.3-0.85	0.46 0.34-0.62	0.17 0.09-0.34	72.4
Meropenem									
1.66 0.09-28	0.63 0.06-6	0.36 0.03-3.37	0.54 0.17-1.7	0.32 0.07-1.3	0.18 0.05-0.58	0.21 0.06-0.73	0.18 0.05-0.69	1.52 0.14-16	87.2

Tabela 11: OR com respetivos IC e AUC dos modelos multivariados 3 a 10

Salienta-se que o sexo masculino, a residência em lar, internamento ≤ 90 dias, antibioterapia ≤ 30 dias e isolamento de agente MR ≤ 1 ano, estão associados de forma consistente a maior risco de resistência antibiótica. Apesar de não associado a isolamento de agente microbiano MR e produtor de ESBL, a presença de cateter urinário está associado a maior risco de resistência à amoxicilina com clavulanato, cefuroxime, ceftriaxone e meropenem.

Os resultados das probabilidades preditas estão expostos na Tabela 12. De acordo com os resultados, apresenta um código de cores de acordo com as recomendações da sociedade portuguesa de doenças infecciosas para a elaboração de cartas epidemiológicas de apoio à terapêutica antimicrobiana empírica, estando definida a cor verde quando suscetibilidade ao antibiótico é maior do que 80%, amarelo quando suscetibilidade de 50 a 80% e vermelho se suscetibilidade é inferior a 50%¹⁷.

	Sem FR		Lar		Cateter		Int ≤ 30 dias		Ab ≤ 90 dias		MR ≤ 1 ano	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Amoxicilina + Clavulanato												
18 - 40 anos	0.926	0.860	0.747	0.605	0.840	0.731	0.868	0.733	0.742	0.598	0.713	0.563
41 - 64 anos	0.893	0.813	0.676	0.519	0.788	0.658	0.823	0.706	0.670	0.511	0.637	0.476
65 - 80 anos	0.872	0.779	0.629	0.466	0.751	0.609	0.790	0.661	0.622	0.459	0.587	0.424
≥ 80 anos	0.869	0.774	0.622	0.459	0.745	0.602	0.785	0.654	0.615	0.452	0.580	0.417
Cefuroxime												
8 - 40 anos	0.936	0.832	0.830	0.624	0.866	0.687	0.875	0.703	0.824	0.613	0.739	0.489
41 - 64 anos	0.944	0.851	0.849	0.656	0.882	0.717	0.889	0.732	0.843	0.646	0.765	0.524
65 - 80 anos	0.908	0.771	0.769	0.530	0.815	0.599	0.826	0.617	0.760	0.518	0.657	0.394
≥ 80 anos	0.905	0.765	0.762	0.521	0.809	0.590	0.821	0.608	0.754	0.509	0.649	0.385
Ceftriaxone												
18 - 40 anos	0.946	0.858	0.865	0.689	0.879	0.716	0.884	0.724	0.835	0.637	0.752	0.511
41 - 64 anos	0.957	0.886	0.891	0.739	0.903	0.763	0.907	0.771	0.867	0.692	0.795	0.573
65 - 80 anos	0.935	0.832	0.839	0.644	0.856	0.673	0.861	0.682	0.806	0.589	0.712	0.461
≥ 80 anos	0.924	0.807	0.815	0.604	0.834	0.635	0.840	0.645	0.778	0.548	0.677	0.420
Piperacilina+Tazobactam												
18 - 40 anos	0.951	0.912	0.906	0.837	0.934	0.884	0.868	0.733	0.826	0.717	0.734	0.595
41 - 64 anos	0.955	0.919	0.827	0.718	0.939	0.892	0.913	0.848	0.834	0.734	0.750	0.615
65 - 80 anos	0.941	0.895	0.783	0.658	0.921	0.862	0.888	0.808	0.796	0.676	0.694	0.547
≥ 80 anos	0.930	0.876	0.749	0.613	0.906	0.838	0.867	0.777	0.763	0.632	0.652	0.499
Aztreonam												
18 - 40 anos	0.886	0.745	0.761	0.544	0.869	0.714	0.799	0.598	0.782	0.574	0.579	0.340
41 - 64 anos	0.946	0.869	0.878	0.730	0.937	0.849	0.900	0.772	0.890	0.753	0.757	0.539
65 - 80 anos	0.923	0.820	0.832	0.650	0.911	0.795	0.860	0.698	0.848	0.677	0.681	0.445
≥ 80 anos	0.911	0.793	0.806	0.610	0.897	0.766	0.839	0.661	0.825	0.639	0.643	0.403
Meropenem												
18 - 40 anos	0.998	0.997	0.996	0.993	0.993	0.988	0.994	0.990	0.994	0.989	0.999	0.998
41 - 64 anos	0.999	0.998	0.997	0.996	0.996	0.993	0.996	0.994	0.996	0.993	0.999	0.999
65 - 80 anos	0.998	0.996	0.994	0.990	0.990	0.982	0.992	0.985	0.990	0.983	0.998	0.997
≥ 80 anos	0.996	0.994	0.990	0.982	0.983	0.969	0.986	0.975	0.984	0.971	0.998	0.996
Gentamicina												
18 - 40 anos	0.912	0.912	0.814	0.700	0.934	0.884	0.906	0.837	0.826	0.717	0.734	0.595
41 - 64 anos	0.955	0.919	0.827	0.718	0.939	0.892	0.913	0.848	0.838	0.734	0.750	0.615
65 - 80 anos	0.941	0.895	0.783	0.658	0.921	0.862	0.888	0.808	0.796	0.676	0.694	0.547
≥ 80 anos	0.930	0.876	0.749	0.613	0.906	0.838	0.867	0.777	0.763	0.632	0.652	0.499
Ciprofloxacina												
18 - 40 anos	0.939	0.905	0.820	0.740	0.934	0.899	0.897	0.845	0.854	0.785	0.781	0.689
41 - 64 anos	0.913	0.867	0.757	0.660	0.907	0.859	0.857	0.788	0.800	0.714	0.709	0.603
65 - 80 anos	0.885	0.828	0.696	0.588	0.878	0.818	0.815	0.732	0.746	0.647	0.642	0.527
≥ 80 anos	0.890	0.835	0.706	0.599	0.883	0.824	0.821	0.741	0.755	0.657	0.652	0.539

Tabela 12: Probabilidade previstas de sucesso da terapêutica antibiótica empírica



Capítulo 4

Discussão

As recomendações da direção geral de saúde (DGS) para o tratamento empírico da pielonefrite aguda, são como primeira linha o ceftriaxone e, em caso de intolerância ou alergia, a levofloxacina. Estas recomendações foram publicadas em 2011 e dados relativos a 2017, mostram que em Portugal, a *Escherichia coli* é resistente às cefalosporinas de 3ª geração em 15.6% e às fluoroquinolonas em 25.3%⁹. Relativamente a *Klebsiella pneumoniae* os mesmos dados reportam resistência às cefalosporinas de 3ª geração em 44.9% e às fluoroquinolonas em 45.7%⁹. Perante estes dados, torna-se fundamental as organizações locais de saúde conhecerem a flora microbiana local, bem como identificarem sub-populações em que o isolamento de agentes microbianos com perfil de resistências problemático é mais provável.

No nosso estudo foi possível estabelecer uma associação entre determinadas características e o isolamento em UC de bactéria MR e/ou produtora de ESBL, permitindo a identificação de sub-populações que possam beneficiar de abordagem antibiótica diferente da sugerida pela DGS. Através modelos de análise multivariada foi possível identificar os seguintes fatores de risco:

Fator de risco para isolamento de bactéria MR	
65 - 79 anos	OR 1.27
≥ 80 anos	OR 1.69
Internamento ≤ 30 dias	OR 1.72
Antibioterapia ≤ 90 dias	OR 3.37
Residência em lar	OR 3.43
Isolamento de MR ≤ 1 ano	OR 6.24

Tabela 13: FR para isolamento de bactéria MR

Fator de risco para isolamento de bactéria ESBL	
65 - 79 anos	OR 1.57
Sexo masculino	OR 1.41
Antibioterapia ≤ 90 dias	OR 3.17
Residência em lar	OR 3.21
Isolamento de MR ≤ 1 ano	OR 6.84

Tabela 14: FR para isolamento de bactéria ESBL

Apesar de ser mais expectável a falência da terapêutica antibiótica empírica quando a bactéria tem critérios de MR, tal pode não ser necessário para o insucesso do tratamento. Bactérias como a *Klebsiella pneumoniae* e a *Pseudomonas aeruginosa*, por norma têm um perfil de sensibilidade que limitam as opções terapêuticas. Um estudo realizado em Portugal, em que foram analisados os agentes isolados em UC, reforçam esta afirmação⁶. Passadouro e colegas, reportam sensibilidade da *Klebsiella pneumoniae* à amoxicilina com clavulanato de 71%, ao cefuroxime de 65.5%, ao ceftriaxone de 75.8% e à ciprofloxacina 65.4%. Já relativamente a *Pseudomonas aeruginosa*, esta bactéria é naturalmente resistente a múltiplos antibióticos, como é exemplo as aminopenicilinas e as cefalosporinas de 2^a e 3^a geração. No mesmo estudo é descrita sensibilidade às ciprofloxacina de 57%, à piperacilina com tazobactam 62.7%, à gentamicina 86.5% e ao imipenem 72.3%⁶. O relatório anual da EARS-Net, dados referentes a Portugal em 2017 (relativos à *Pseudomonas aeruginosa*), reporta resistência à piperacilina com tazobactam de 24.2%, às fluoroquinolonas de 23.7%, aos aminoglicosídeos de 12.1% e aos carbapenemes de 18.3%⁹.

O que verificámos, foi que na presença de fatores de risco para resistência antibiótica, a frequência relativa da *E. coli* diminui, enquanto que a frequência relativa da *Klebsiella pneumoniae* e da *Pseudomonas aeruginosa* aumentam, sendo a magnitude do aumento dependente do fator de risco em questão. Tendo em conta a terapêutica recomendada, o risco de insucesso da terapêutica empírica será superior nestas subpopulações.

Num estudo com características semelhantes ao apresentado neste documento, Sebastian Bischoff e colegas¹⁹, analisaram os resultados de UC realizadas num Serviço de Urgência, tendo em conta características dos doentes similares às utilizadas no nosso estudo, nomeadamente: sexo masculino, residência em lar, internamento nos últimos 30 dias, antibioterapia nos últimos 30 dias, portador de cateter urinário, ITU de repetição e

transplantação renal. Utilizando técnicas de regressão logística multivariada estas características foram identificadas com FR para RA e MR, concluindo-se que a suscetibilidade aos antibióticos era dependente destes fatores¹⁹.

O nosso objetivo final, foi a criação de uma ferramenta que assista os médicos a melhorar a exatidão da terapêutica empírica da pielonefrite aguda (Tabela 12), utilizando o antibiótico com menor espectro de ação, com menor risco de indução de resistências e menor toxicidade. Atendendo ao problema global das RA, nomeadamente o risco associado a produção de ESBL induzido pelas cefalosporinas (especialmente a as de 3ª e 4ª geração), as resistências elevadas às fluoroquinolonas e o problema crescente de bactérias produtoras de carbapenemases, a escolha de antibióticos tem que ser cuidadosa mas ainda assim, não colocar em risco um doente em particular^{9,19,20,22}. Esta tabela tem em conta o escalão etário, o género e os restantes fatores de risco para RA, permitindo individualizar o tratamento da ITU, e potencialmente diminuir o risco de insucesso da terapêutica empírica e a prescrição de antibióticos problemáticos. Na Tabela 15, está disposta uma proposta para o tratamento empírico da pielonefrite aguda:

	Género	18 - 40 anos	41 - 64 anos	65 - 80 anos	≥ 80 anos
Sem FR	F	Amoxicilina + clavulanato			
	M	Amoxicilina + clavulanato		Ceftriaxone ou Gentamicina	
Cateter urinário	F	Cefuroxime			
	M	Piperacilina + tazobactam ou Gentamicina			
Lar	F	Cefuroxime		Ceftriaxone	
	M	Piperacilina + tazobactam ou Meropenem		Meropenem	
Int ≤ 30 dias	F	Amoxicilina + Clavulanato		Cefuroxime	
	M	Ceftriaxone			
Ab ≤ 90 dias	F	Cefuroxime		Ceftriaxone	
	M	Piperacilina + tazobactam ou Meropenem			
MR ≤ 1 Ano	F	Meropenem			
	M				

Tabela 15: Proposta para terapêutica empírica

O critério de escolha do antibiótico foi uma probabilidade predita de sucesso $\geq 80\%$. Em situações em que, cumprindo este critério as opções são limitadas ao meropenem, nomeadamente, doentes do sexo masculino provenientes de lar ou que realizaram antibioterapia nos últimos 90 dias, admitiu-se probabilidade de sucesso $\geq 70\%$, ficando a opção do meropenem reservado para situações clínicas graves, como quando sépsis associada. Situações em que um doente tem mais que um fator de risco (21.1% na amostra em estudo), as opções para a terapêutica empírica serão mais limitadas, pelo que se sugere a ponderação caso a caso.

Existem pontos fracos no nosso estudo que merecem ser salientados. Em primeiro lugar, a colheita de dados foi realizada de forma retrospectiva, com base na consulta de múltiplas bases de dados, pelo que é possível que exista um sub-registo dos fatores de risco para RA, traduzindo-se na admissão no modelo de doentes falsos negativos para a presença. Em segundo lugar, a maioria dos modelos têm uma capacidade discriminatória aceitável, o que pode significar que existem outros fatores determinantes no risco de RA que não foram contemplados nos modelos. Foram experimentados vários modelos, incluindo o estudo de interações entre covariáveis, mas os resultados piores. Por fim, a proposta terapêutica é baseada em probabilidades preditas, cuja aplicabilidade individual não foi testada.



Capítulo 5

Conclusão

O nosso estudo permitiu identificar sub-populações de doentes com maior chance de resistência aos antimicrobianos e falência da terapêutica antibiótica empírica, nomeadamente: idade ≥ 65 anos, sexo masculino, portadores de cateter urinário crónico, internamento nos últimos 30 dias, antibioterapia nos últimos 90 dias e isolamento de agente MR no último ano e residência em lar. As quatro últimas características são as mais consistentes, nos vários modelos desenvolvidos, e com maior risco de RA.

Foi possível construir uma tabela com as probabilidades preditas de sucesso, para os antibióticos disponíveis e adequados para o tratamento de uma pielonefrite aguda. Nessa tabela é tido em conta o escalão etário, o género e a presença ou ausência dos restantes fatores de risco. Permitiu assim contruir uma ferramenta e uma proposta para a terapêutica antibiótica empírica, utilizando o antibiótico com menor espetro e com menor potencial de gerar resistências aos antibióticos.

Uma utilidade futura do trabalho expresso neste documento, seria a criação de uma aplicação informática que efetuasse recolha prospetiva dos dados relativos aos FR, os sistematizasse e que fosse “aferindo” as conclusões apresentadas. Assim os resultados seriam mais precisos, atualizados no tempo, tornando-se uma ferramenta útil e de fácil utilização.

Bibliografia

1. Bennett, John E.; Dolin, Raphael; Blaser, Martin J. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015
2. Ana L. Flores-Mireles, Jennifer N. Walker, Michael Caparon, and Scott J. Hultgren. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015 May; 13(5): 269–284.
3. Jacob E. Simmering, Fan Tang, Joseph E. Cavanaugh, Linnea A. Polgreen, and Philip M. Polgreen. The Increase in Hospitalizations for Urinary Tract Infections and the Associated Costs in the United States, 1998–2011. *Open Forum Infect Dis.* 2017 Winter; 4(1)
4. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos. Infeções e Resistências aos Antimicrobianos. Relatório Anual do Programa Prioritário 2018.
5. Tandogdu Z, Wagenlehner FM. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2016 Feb;29(1):73-9.
6. Rui Passadouro, Raquel Fonseca, Felícia Figueiredo, Andreia Lopes, Cristina Fernandes. Evaluation of the Antimicrobial Susceptibility of Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Acta Med Port* 2014 Nov-Dec;27(6):737-742.
7. Foxman, B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* 7, 653–660.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2018.
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018.
10. Horcajada JP, Shaw E, Padilla B, Pintado V, Calbo E, Benito N, Gamallo R, Gozalo M, Rodriguez-Bano J, group I et al: Healthcare-associated, community-acquired and hospital-acquired bacteraemic urinary tract infections in hospitalized patients: a prospective multicentre cohort study in the era of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Infect* 2013, 19(10):962-968.

11. Tenney J, Hudson N, Alnifaigy H, Li JTC, Fung KH. Risk factors for acquiring multidrug-resistant organisms in urinary tract infections: A systematic literature review. *Saudi Pharm J*. 2018;26(5):678-684.
12. Andreu A, Alós J, Gobernado M, Marco F, Rosa M, Rodriguez J: Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico. *Rev Esp Quimioterapia* 2005; 20:124-135.
13. Joumana N Samaha-Kfoury, George F Araj. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. *BMJ* 2003;327:1209–13.
14. S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81.
15. Hosmer, DW, Lemeshow, SL. *Applied Logistic Regression*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, 2000.
16. Turkman MAA, Silva GL (2000). *Modelos Lineares Generalizados - da teoria à prática*. SPE. <http://docentes.deio.fc.ul.pt/maturkman/mlg.pdf>.
17. Rhodes A, Evans L, Alhazzani W et al (2017) Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med* 43:304–377
18. M. H. Ramos, C. P. Vaz, M. G. Ribeiro, M. Pinto, V. Alves, Grupo de Microbiologistas de Hospitais Portugueses. Consenso em microbiologia clínica: uniformização de cartas epidemiológicas hospitalares de apoio à terapêutica antimicrobiana empírica. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*. Volume 13, Nº 1, Janeiro > Abril de 2017.
19. Sebastian Bischoff, Thomas Walter, Marlis Gerigk, Matthias Ebert and Roger Vogelmann. Empiric antibiotic therapy in urinary tract infection in patients with risk factors for antibiotic resistance in a German emergency department. *BMC Infectious Diseases* (2018) 18:56
20. Deepti Rawat and Deepthi Nair. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010 Sep-Dec; 2(3): 263–274.

21. George A. Jacoby. AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2009, p. 161–182
22. Tom Fawcett. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 27 (2006) 861–874