VOLUME 6 02/ RPDI

Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas
Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica

Maio > Agosto 2010 ISSN 1646-3633

Bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*

Importância clínica na terapêutica

/66

/55 Comparação de duas metodologias para a detecção do mecanismo de resistência indutível à clindamicina em estirpes de *Staphylococcus* spp.

/60 Hemoculturas positivas num Serviço de Urgência Pediátrica

/72 Tuberculose Pancreática: A propósito de um caso clínico

/79 Hepatite colestática por infecção a Epstein-Barr tratada por Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS)



www.spdi.org
Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica

RPDI

Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas

Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica

Volume 6, N.º 2, Maio > Agosto de 2010 | Publicação Quadrimestral | 3.ª Série

Ficha Técnica

/ Propriedade, Edição e Publicidade
Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica
Largo Fernandes Costa, 5 Cave, Dta
1700-187 Lisboa
Tel. / Fax: 217 950 462
E-mail: spdimc@gmail.com

/ Director
Prof. Doutor António Meliço-Silvestre

/ Paginação
Menta Design de Comunicação, Lda

/ Revisão
Dra. Ângela Barroqueiro

/ Impressão
Papelmunde – SMG, Lda

/ Créditos fotográficos
capa, página 52 e 69 – ©iStockphoto.com / ksass
página 57 – ©iStockphoto.com / Valentin Casarsa
página 62 – ©iStockphoto.com / Ilya Andriyanov
página 67 – ©iStockphoto.com / Alexander Raths
página 76 – ©iStockphoto.com / Richard Scherzinger

/ Depósito legal
246017/06

/ Tiragem
1000 exemplares

/ Distribuição
CTT

/ Número Avulso
8,75 euros

/ Assinatura Anual
Portugal – 25 euros
Outros países – 45 euros

/ ISSN 1646-3633

A revista Portuguesa de Doenças Infecciosas é uma revista médica quadrimestral (publicam-se os números de: Janeiro/Abril, Maio/Agosto e Setembro/Dezembro) excluída do registo no ICS de acordo com a alínea a) do art. 12.º do DR n.º8/99 de Junho de 1999.

Reservados todos os direitos, de acordo com a lei.
Copyright SPDI.

Corpos Sociais da SPDIMC

/ Direcção
Presidente - Prof. Dr. Kamal Mansinho
Vice-Presidente - Prof. Doutora Teresa Marques
Secretário - Dr. Fernando Maltez
Tesoureiro - Dr. Fernando Borges
Vogal - Prof. Doutor Francisco Antunes

/ Assembleia-Geral
Presidente - Prof. Doutor Henrique Lecour
Vice-Presidente - Dra. Helena Coelho
Secretário - Dra. Valquíria Alves

/ Conselho Fiscal
Presidente - Prof. Doutor António Meliço-Silvestre
Vice-Presidente - Prof. Doutor Saraiva da Cunha
Vogal - Dra. Maria da Graça Carvalho Ribeiro

Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas

/ Director
Prof. Doutor António Meliço-Silvestre

/ Director Honorário
Prof. Doutor Carvalho Araújo

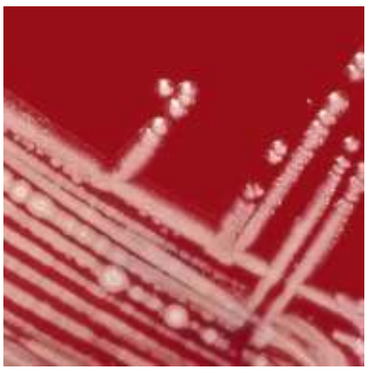
/ Editor
Prof. Doutor Saraiva da Cunha

/ Conselho Científico
Prof. Doutor António Sarmento
Prof. Doutora Cidália Pina Vaz
Dr. Fernando Maltez
Prof. Doutor Francisco Antunes
Dr. Germano do Carmo
Prof. Dra. Helena Ramos
Prof. Doutor Henrique Lecour
Prof. Dr. Kamal Mansinho
Prof. Doutor Rui Sarmento e Castro
Prof. Doutora Teresa Marques

/ Comissão de Honra Nacional
Dr. Abílio Morgado (Lisboa)
Dr. Alves Pereira (Porto)
Dr. A. Rocha Marques (Porto)
Dr. António Vieira (Coimbra)
Dr. António Malhado (Lisboa)
Prof. Doutor A. Torres Pereira (Lisboa)
Prof. Doutor Armando Porto (Coimbra)
Prof. Doutor Armindo Filipe (Lisboa)
Dr. Carlos Araújo (Lisboa)
Prof. Doutor Cerqueira Magro (Porto)
Prof. Doutor David Morais (Évora)
Prof. Dr. J. Mello Vieira (Lisboa)
Prof. Doutor Melo Cristino (Lisboa)
Dr. Jorge Nóbrega Araújo (Funchal)
Dr. José Poças (Setúbal)
Dr. José Neves (Lisboa)
Dra. Leonor Carvalho (Lisboa)
Dr. Nogueira de Lemos (Coimbra)
Dra. Maria João Águas (Almada)
Prof. Doutor Mota Miranda (Porto)
Dr. Pita Groz Dias (Lisboa)
Dr. Rui Côrte-Real (Coimbra)
Dr. Rui Proença (Lisboa)

/ Comissão de Honra Internacional
Prof. Dr. André Villela Lomar (Brasil)
Prof. Dr. Evelio Perea (Espanha)
Prof. Dr. J. Pedreira Andrade (Espanha)
Prof. Dr. José Ángel García-Rodríguez (Espanha)
Prof. Dr. José Prieto (Espanha)
Prof. Dr. Juan Gestal Otero (Espanha)
Prof. Dr. Juan González-Lahoz (Espanha)
Prof. Dr. Juan Picazo (Espanha)
Prof. Dr. Luis Enrique Morano Amado (Espanha)
Prof. Dr. Roberto Focaccia (Brasil)
Prof. Dr. Rogério Pedro (Brasil)
Prof. Dr. Sérgio Cimerman (Brasil)
Prof. Dr. Vicent Soriano (Espanha)

02/RPDI
Maio > Agosto de 2010 / Vol. 6 > N.º 2



EDITORIAL / *EDITORIAL*

53 A "poluição" científica, na área médica, em Portugal
/ Saraiva da Cunha

ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

55 Comparação de duas metodologias para a detecção do mecanismo de resistência indutível à clindamicina em estirpes de *Staphylococcus* spp.
/ J. Teixeira / H. Ramos

ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

60 Hemoculturas positivas num Serviço de Urgência Pediátrica
/ F. Leite / C. Faria

66 Bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*: importância clínica na terapêutica
/ C. Caneiras / C. Marcos / T. Ferreira / T. Hanscheid / J. Melo-Cristino / A. Duarte

CASO CLÍNICO / *CLINICAL CASE*

72 Tuberculose Pancreática: A propósito de um caso clínico
/ M. Barbedo / A. Castro / C. Pinto / M. Mota / J. Valente

79 Hepatite colestática por infecção a Epstein-Barr tratada por Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS)
/ S. Lourenço / F. Caeiro / M. H. Pacheco / G. Martins / R. Perdigoto / J. A. Malhado

84 Agenda / *Notebook*

85 Fórum

86 Checklist

EDITORIAL / *EDITORIAL*

A "poluição" científica, na área médica, em Portugal



/ Prof. Doutor Saraiva da Cunha
Editor da Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas

Esta minha curta reflexão tem por pano de fundo a realização do X Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica e do VIII Congresso Nacional sobre SIDA, organização conjunta da Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica (SPDIMC) e da Associação Portuguesa para o Estudo Clínico da SIDA (APECS). Acontecimento raro, em Portugal, conseguir o entendimento de duas sociedades científicas para organizarem, com regularidade e conjuntamente, um evento científico. Felicito os Presidentes de ambas as organizações, o Prof. Dr. Kamal Mansinho e o Prof. Doutor Rui Sarmento e Castro, bem como todos os membros das respectivas direcções, pela lucidez e visão estratégica que demonstraram ao conseguir este acordo.

Este paradigma parece-me ser um caminho sem retorno. A comunidade científica nacional no campo das ciências médicas (e da biomedicina) não tem dimensão nem produção para justificar a multiplicidade de reuniões científicas anuais a que todos assistimos. Nem sequer o avanço do conhecimento nas diferentes áreas é uma razão suficiente para multiplicarmos, até à exaustão, o número de congressos, reuniões e jornadas com que somos permanentemente assediados.

Os financiadores de toda esta "agitação científica", leia-se a indústria farmacêutica, pois desde sempre os organismos oficiais do Ministério da Saúde se demitiram da responsabilidade da pós-graduação em Portugal, também não estão isentos de culpas, pois voluntária ou involuntariamente têm suportado esta cavalgada de reuniões, sem que tenham tido o cuidado de definir, de forma clara e inequívoca, requisitos rigorosos para condicionar o patrocínio destas realizações. Se, por meu desconhecimento, o fizeram, não conseguiram que fossem cumpridos.

Outra razão para este cenário advém da proliferação de Sociedades Científicas, muitas delas apenas justificadas pelo voluntarismo da sua "comissão instaladora", que espartilham o conhecimento científico em parcelas minúsculas e multiplicadas até ao infinito, como se fosse possível que alguém contribua para o progresso da ciência sem se submeter ao espírito crítico de outras vozes e de outras visões do saber. Estas "comissões instaladoras" perpetuam-se no controlo dos órgãos sociais das respectivas sociedades, alternando funções em todos eles, não por especial mérito ou vocação, mas tão simplesmente porque os restantes sócios destas sociedades se alheiam totalmente da sua vivência e das respectivas actividades (confira-se o número de presenças nas respectivas assembleias-gerais). No domínio das Doenças Infecciosas isto é bem notório, pois para além da SPDIMC estão activas em Portugal organizações no campo da infecção VIH/SIDA (várias), das doenças infecciosas pediátricas, das doenças víricas, das hepatites, das doenças parasitárias, das doenças tropicais e da hidatidose, para citar apenas as que conheço. Outras porventura existirão.

A maioria (todas!) destas organizações, para sobreviver financeiramente, tem de atestar periodicamente que está "viva". Nada melhor, sendo mesmo o "atestado" mais fácil de obter, que organizar a respectiva "reunião científica", com a conivência da indústria farmacêutica em toda esta farsa. Desfecho de tudo isto: inúmeros congressistas inscritos

(pela indústria farmacêutica), salas de reuniões onde decorrem as sessões escandalosamente despidas de participantes, translação para território nacional dos avanços científicos (muitos deles de duvidosa utilidade) que alguns privilegiados obtêm pela presença em Congressos Internacionais, e que muitos dos presentes já conheciam pela presença nos mesmos Congressos ou pela leitura da bibliografia disponível.

Acresce a tudo isto que praticamente todas as Unidades e Serviços de Doenças Infecciosas dos hospitais públicos, descapitalizados pela tutela e sem disponibilidades financeiras para investir na pós-graduação e na melhoria de instalações e equipamentos, recorre ao estratagema de organizar periodicamente a "sua" reunião científica, com o intuito de conseguir ultrapassar alguns destes constrangimentos.

Este modelo, que vigora ainda hoje em Portugal, está esgotado. Dois factos vão contribuir para a sua liquidação: os constrangimentos financeiros das empresas da indústria farmacêutica (estas em número cada vez mais reduzido em consequência do ciclo de contracção e de concentração a que se assiste no sector) e a facilidade de acesso ao conhecimento científico, em resultado da banalização das novas tecnologias de informação e comunicação.

Exige-se pois a construção de um modelo alternativo ao actual, que vai necessitar de dois contributos fundamentais. Por um lado, as diversas sociedades científicas devem fazer um esforço de convergência para que o conhecimento não fique fragmentado e desconexo, mas também a indústria farmacêutica deve contribuir para "facilitar" todo este processo, aplicando critérios rigorosos de financiamento das reuniões científicas.

Tal como a poluição, a proliferação de (pseudo)reuniões científicas é uma marca do presente que importa combater para que não se torne insuportável (sobre)viver no mundo das ciências médicas em Portugal.

ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

Comparação de duas metodologias para a detecção do mecanismo de resistência indutível à clindamicina em estirpes de *Staphylococcus* spp.

Comparison of Two Methodologies for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcus spp.

/ J. Teixeira[1] / H. Ramos[2]

[1] Técnico Análises Clínicas, Serviço de Microbiologia, Centro Hospitalar do Porto, HSA
[2] Directora do Serviço de Microbiologia, Centro Hospitalar do Porto, HSA

Correspondência:
Júlio Manuel Pereira Teixeira
Rua Afonso Henriques, 2573, 6ª hab 5
4425-057 Águas Santas – Maia
Portugal
Telemóvel: 91 4151800
e-mail: juliompt37@gmail.com

/ Resumo

Os microrganismos em estudo pertencem ao género *Staphylococcus*, são reconhecidos como uma das principais causas de infecções adquiridas na comunidade e de infecções nosocomiais. Os mecanismos de resistências desenvolvidos por estes agentes, nomeadamente o mecanismo de resistência induzida, têm dificultado o tratamento de infecções. Os resultados dos métodos automáticos de susceptibilidade aos antimicrobianos num Laboratório de Microbiologia podem suscitar frequentemente dúvidas, e não se mostrarem eficazes. Este estudo teve como objectivo estudar a detecção do mecanismo de resistência induzida à clindamicina comparando os resultados obtidos no sistema VITEK® 2 da bioMérieux usando a carta AST-P580 com o método de indução, método reconhecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI). Verificou-se que a espécie predominante era *Staphylococcus aureus* e que grande parte do género possuía fenótipo de resistência susceptível (43%), no que se refere à resistência induzida verificou-se 30% no global. Como resposta ao objectivo do estudo, ficou concluído que o resultado da indução à clindamicina usando a carta AST-P580 evidencia uma total concordância de resultados com o método de indução.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, Resistência, Clindamicina.

/ Abstract

The studied microorganisms belong to Staphylococcus genus; they are recognized as one of the main causes of community-acquired and nosocomial infections. The resistance mechanisms developed by these agents, namely the induced resistance mechanism, have made it difficult for the treatment of the infections. The results of automatic methods for antimicrobial susceptibility in a Microbiology Laboratory can cast numerous doubts, and not reveal effectiveness. The present research was performed to study the detection of inducible clindamycin resistance mechanism, comparing the results obtained with VITEK® System using card AST-580 (BioMérieux) and with Induction method, recognized method for the Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI). The results showed that

Staphylococcus aureus was the predominant species and that a high percentage of the genus exhibited susceptible resistance phenotype (43%); overall, 30% demonstrated induced resistance. This study indicated that there is a total concordance in the results given by the two methods (the usage of card AST-580 and the induction method).

Key-words: *Staphylococcus, Resistance, Clindamycin.*

/ Introdução

Os *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa são reconhecidos como uma das principais causas de infecções adquiridas na comunidade e de infecção nosocomial a nível mundial[1]. Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos por estes agentes têm sido motivo de preocupação para a classe médica. O grupo de antibióticos actualmente usado no tratamento das infecções estafilocócicas como alternativa aos *ß*-lactâmicos é o grupo (MLS_B): macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) e estreptograminas B[2]. Estes antibióticos pertencem a classes diferentes, mas têm essencialmente o mesmo mecanismo de acção, inibem a síntese das proteínas ligando-se às subunidades ribossomais 50S da parede celular bacteriana. Tal como nas penicilinas, tem-se verificado um aumento das resistências associadas a estes antibióticos. A resistência por mecanismo de efluxo e a resistência devido à metilação ribossomal do alvo de acção são os dois mecanismos de resistência mais frequentes. O mecanismo de efluxo confere resistência somente aos macrólidos e estreptograminas B e é conhecido como fenótipo de resistência MS_B. A resistência devido à metilação ribossomal confere resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B e é conhecido como fenótipo de resistência MLS_B[3, 4, 5]. Esta última pode apresentar-se como constitutiva (fenótipo $^cMLS_B$) ou induzida (fenótipo $^iMLS_B$). Está demonstrado que a resistência constitutiva à clindamicina pode ser detectada pelos métodos de susceptibilidade tradicionais de rotina. No que refere à resistência induzida isso já não se verifica. Conhecer o fenótipo de resistência é importante, pois permite prescrever o antimicrobiano correcto ao paciente. Estudos efectuados demonstraram insucesso clínico em pacientes infectados com estirpes com fenótipo de resistência induzida $^iMLS_B$ quando medicados com clindamicina[6]. Os métodos automáticos utilizados na maioria dos Laboratórios de Microbiologia não se mostram eficazes na detecção deste mecanismo de resistência. O objectivo deste projecto foi comparar o teste de indução utilizado no Serviço de Microbiologia com a nova carta AST-P580 do sistema VITEK® 2 (BioMérieux, Marcy, L'Etoile, France), de modo a verificar o seu desempenho para possível utilização na rotina laboratorial.

/ Material e Métodos

Foram estudadas um total de 297 estirpes de *Staphylococcus spp* (ver *Gráfico 1*), isoladas de amostras com interesse clínico no Serviço de Microbiologia do HGSA, entre Abril e Junho de 2009. Destes 221 *Staphylococcus aureus,* 45% (135) eram *Staphylococcus aureus meticilino-resistentes* (STAUMR), 29% (86) *Staphylococcus aureus meticilino-sensíveis* (STAUMS) e 26% (76) *Staphylococcus coagulase negativa (SCN).*

As estirpes foram identificadas com recurso ao sistema semi-automático Vitek® 2, de acordo com o protocolo do fabricante (BioMérieux, Marcy, L'Etoile, France). O estudo da susceptibilidade antimicrobiana foi executado pelo método semi-automático Vitek® 2, recorrendo à carta AST-P580, de acordo com o protocolo do fabricante (BioMérieux, Marcy, L'Etoile, France). No controlo de pureza da detecção da susceptibilidade,

efectuou-se o teste de indução, método prático para detecção da resistência induzida à clindamicina, que consiste em colocar um disco de eritromicina (15µg) a 15 mm de distância de um disco de clindamicina (2µg) sobre a placa, confluente para o crescimento, (CLSI 2003) [7]. Após incubação de 16 a 24h a 35ºC, as zonas de inibição foram examinadas para detectar qualquer achatamento da forma do halo da clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (zona D), que indica resistência induzida. O crescimento até ao disco de clindamicina indica resistência constitutiva. O organismo que não apresentar halo de inibição da clindamicina será considerado sensível.

/ Resultados

A comparação entre os resultados dos testes de indução e da carta de susceptibilidade AST-P580 do Vitek® 2 evidencia uma total concordância de resultados, 100% (*Quadro I*).

No que se refere à detecção da resistência induzida da clindamicina: das 297 estirpes, 43% obtiveram o fenótipo sensível à clindamicina, 30% o fenótipo de resistência induzida e 16% resistência constitutiva. 11% das estirpes apresentaram resistência apenas à eritromicina, fenótipo MS_B (*Quadro II*).

A resistência induzida predomina sobre a resistência constitutiva e o fenótipo sensível (46%, 30% e 21% respectivamente) entre os isolados de STAUMR. O fenótipo sensível predomina em larga maioria (84%) entre os isolados de STAUMS. Entre os isolados de SCN verificou-se que predomina (31%) a resistência induzida, sobre a sensível e a resistência constitutiva, 25% e 17%, respectivamente (*Quadro I*).

/ Discussão e Conclusão

A crescente frequência de infecções provocadas por estirpes de *Staphylococcus* e a mudança no padrão de resistência, conduziram ao interesse renovado no uso da terapia pela clindamicina para tratar tais infecções. A clindamicina é uma boa alternativa para o tratamento de infecções provocadas por *Staphylococcus* resistentes e sensíveis à meticilina[8]. Desde 2004 o CLSI recomenda o uso do teste de indução e sugere que as estirpes com o fenótipo de resistência induzida sejam relatadas como clindamicina resistente[9]. Neste estudo os resultados indicam que o STAUMR é a espécie mais predominante no período em análise. Verificou-se uma incidência elevada (30%) do fenótipo induzido, tal como noutros estudos[10]. Conferiu-se também que grandes partes das estirpes (43%) eram susceptíveis à eritromicina e à clindamicina, as quais poderão constituir uma opção terapêutica com estas drogas. No que se refere à comparação dos dois métodos, foi demonstrado que a resistência induzida pode ser facilmente detectada quer pelo teste de indução quer no Vitek® 2 pela carta AST-P580, avaliação em que se obteve 100% de

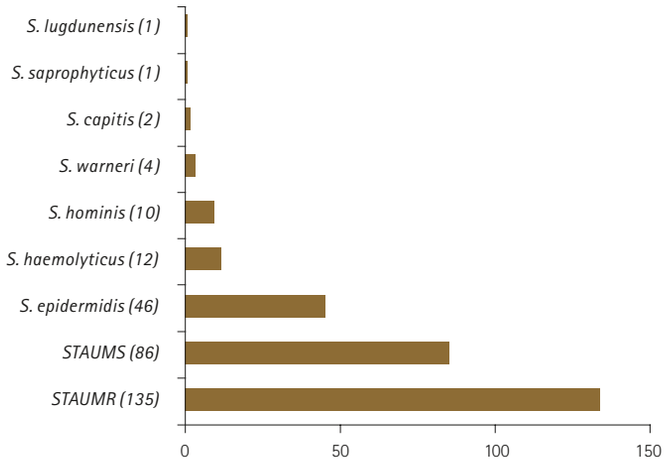


Gráfico 1 — Espécies e frequência das estirpes de *Staphylococcus* estudadas.



QUADRO I – COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DO MÉTODO DE INDUÇÃO COM A CARTA AST-P580 DO VITEK® 2

Estirpe	Fenótipo	N.º de amostras	% de resistências	N.º e % de amostras detectados pelo Teste D	N.º e % de amostras detectadas pelo Vitek
STAUMR (135)	$^{i}MLS_{B}$	62	46%	62 (100	62 (100)
	$^{c}MLS_{B}$	34	30%	34 (100)	34 (100)
	MS_{B}	5	3%	5 (100)	5 (100)
	S/ resistência	34	21%	34 (100)	34 (100)
STAUMS (86)	$^{i}MLS_{B}$	5	7%	5 (100)	5 (100)
	$^{c}MLS_{B}$	1	1%	1 (100)	1 (100)
	MS_{B}	6	8%	6 (100)	6 (100)
	S/ resistência	74	84%	74 (100)	74 (100)
SCN (76)	$^{i}MLS_{B}$	22	31%	22 (100)	22 (100)
	$^{c}MLS_{B}$	14	17%	14 (100)	14 (100)
	MS_{B}	21	27%	21 (100)	21 (100)
	S/ resistência	19	25%	19 (100)	19 (100)

STAUMR (Staphylococcus aureus meticilino resistente) STAUMS (Staphylococcus aureus meticilino sensível) SCN (Staphylococcus coagulase negativa) $^{i}MLS_{B}$ - fénotipo de resistência induzida; $^{c}MLS_{B}$ - fénotipo de resistência constitutiva; $^{c}MLS_{B}$ - fénotipo de resistência pelo mecanismo de efluxo.

concordância. Com este estudo pretendia-se avaliar o método utilizado na rotina deste laboratório, podendo concluir-se que o teste de indução realizado no Vitek® 2 usando a carta AST-P580 produz resultados que permitem descriminar correctamente entre resistência induzida e constitutivo, podendo assim ajudar a evitar falhas terapêuticas nos doentes administrados com clindamicina.

QUADRO II – CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À CLINDAMICINA

Fenótipo de resistência	Frequência (n=297)	Percentagem
Constitutivo	49	16%
Induzido	89	30%
Sensível	127	43%
Negativo	32	11%

/ Bibliografia

1. Fokas, S., Fokas, S., Tsironi, M., Kalkani, M. & Dionysopouloy, M. "Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide resistant *Staphylococcus* spp." *Clin. Microbiol. Infect.* 2005; *11:* 337-340.
2. Fiobelkorn, K. R., Crawford, S.A., McElmeel, M. L. & Jorgensen, J. H. "Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistence in Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci". *J. Clin. Microbiol.* 2003; *41:* 4740-4744.
3. Goldman, R. C. & Capobianco, J. O. "Role of an energy dependent efflux pump in plasmid $_{p}$NE24-mediated resistance to 14 and 15 memered macrolides in *Staphylococcus epidermidis". Antimicrob. Agents Chemother* 1990; *34:* 1973-1980.
4. Leclercq, R. & Courvalin, P. "Bacterial resistence to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification". *Antimicrob. Agents Chemother* 1991a; *35:* 1267-1272.
5. Leclercq, R. & Courvalin, P. "Intrinsic and unusual resistence to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria". *Antimicrob. Agents Chomether* 1991b; *35:* 1273-1272.
6. Jorgensen, J. H., S. A. Crawford, M. L. McElmeel, and K. R. Fiebelkorn. "Detection of inducible clindamycin resistance of staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing". *J. Clin. Microbiol.* 2004; *42:* 1800-1802.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards *(2003).* "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests approved standard M2-A8. Wayne, PA": National Committee for Clinical Laboratory Standards.
8. Frank, A. L., Marcinak, J. F., Mangat, P. D., Tjhio, J. T., Kelkar, S., Schreckenberger, P. C. & Quinn, J. P. "Clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. Pediatr." *Infect. Dis.* 2002; *21:* 530-534.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards *(2004).* "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, fourteenth informational supplement, document M100-S14. Wayne, PA": National Committee for Clinical Laboratory Standards.
10. Yilmaz, G., K. Aydin, S. Iskender, R. Caylan, I. Koksal. "Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci". *Journal of Medical Microbiol.* 2007; *56:* 342-345.

RPDI
Maio > Agosto 2010 / Vol. 6 > N.º 2

ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

Hemoculturas positivas num Serviço de Urgência Pediátrica

Positive Blood Cultures from a Pediatric Emergency Service

/ F. Leite / C. Faria

Serviço de Pediatria do Hospital S. Teotónio, Viseu – E.P.E.

Correspondência:
Dr.ª Filipa Leite
Rua Dr. Cândido de Pinho, nº30, Bl. C, Hab. 408
4520-211 Santa Maria da Feira
Portugal
Telemóvel: 23 2420500
e-mail: filipasoaresleite@gmail.com

/ Resumo

Introdução: A maioria das crianças febris que recorre a um Serviço de Urgência Pediátrica apresenta uma doença de etiologia vírica, auto-limitada. Em situações seleccionadas é necessária investigação complementar com hemocultura.
Objectivo: Analisar o resultado das hemoculturas positivas por microrganismos patogénicos no Serviço de Urgência, nomeadamente os agentes mais frequentes e respectiva susceptibilidade aos antimicrobianos, a evolução e correlação com a história clínica.
Métodos: Estudo retrospectivo dos dados microbiológicos referentes aos agentes patogénicos isolados nas hemoculturas colhidas em crianças febris, com idade inferior a 16 anos, entre Janeiro de 2003 e Junho de 2007.
Resultados: Neste período, foram pedidas 3264 hemoculturas, tendo sido obtidas 470 (14%) positivas e, destas, apenas 89 (2.7%) foram consideradas verdadeiras bacteriémias. As bactérias patogénicas mais frequentemente isoladas foram: *Streptococcus pneumoniae* (30.4%), *Neisseria Meningitidis* (15.7%), *Staphylococcus aureus* (13.5%), *Escherichia coli* (13.5%) e *Salmonella* (4.5%). Neste período, 76% das crianças com hemoculturas positivas tinham idade inferior a 36 meses e a maioria (57%) era do sexo masculino.
Conclusão: O *S. pneumoniae* e a *N. meningitidis* são actualmente os microrganismos patogénicos predominantes, sobretudo abaixo dos 36 meses de idade, o que é concordante com outras séries. A monitorização destes dados microbiológicos é muito importante, em termos epidemiológicos e clínicos.

Palavras-chave: Hemocultura; Bacteriémia; Microrganismos patogénicos.

/ Abstract

Introduction: *The majority of febrile children presenting to a Pediatric Emergency Department has a self-limited viral illness. However, blood cultures may, in selected cases, be requested.*
Objective: *To analyze the results of positive blood cultures for pathogens in the Emergency Department, mainly the most frequently isolated agents and antibiograms, its evolution and its correlation with clinical history.*
Methods: *Retrospective analysis of microbiological data of pathogens isolated in*

blood cultures obtained in febrile children, under 16 years, between January 2003 and June 2007.
Results: *During this period, 3264 blood cultures were requested. From this sample, 470 (14%) were positive and, of these, only 89 (2.7%) were considered true bacteraemias. The pathogens most commonly isolated were Streptococcus pneumoniae (30.4%), Neisseria meningitidis (15.7%), Staphylococcus aureus (13.5%), Escherichia coli (13.5%) and Salmonella (4.5%). In this period, 76% of children with positive blood cultures were less than 36 months and the majority (57%) were male.*
Commentary: *S. pneumoniae and N. meningitidis are currently the predominant pathogens, mainly in children under the age of 36 months, which is consistent with other studies. Monitoring of microbiological data is very important in epidemiological and clinical studies.*

Key-words: *Bacteremia, blood, bacteria.*

/ Introdução

A febre é um sintoma que justifica em 10 a 20% a admissão nos Serviços de Urgência Pediátrica.[1, 2] Em Portugal, um estudo de Pinheiro[3], em 2008, refere que a febre é o quinto motivo de referenciação (7%) das crianças, pelos Cuidados de Saúde Primários do distrito de Viseu, para o Hospital de S. Teotónio. Nos E.U.A. é, actualmente, o terceiro motivo mais frequente de atendimento pediátrico de acordo com McCaig.[4]

A abordagem de uma criança febril, com bom estado geral, permanece um tema de grande debate, pela possibilidade de bacteriémia oculta.[5, 6] Na maioria dos casos são crianças saudáveis, com uma doença aguda, de etiologia vírica, frequentemente auto-limitada. Contudo, em 1.5-5% das crianças, uma bacteriémia oculta pode estar presente e os achados clínicos iniciais são indistinguíveis.[1, 2, 5, 7] Por definição, bacteriémia oculta é a condição em que a bacteriémia é identificada em doentes sem evidência clínica de sépsis (choque ou púrpura) ou aspecto tóxico, sem doença crónica subjacente significativa ou foco evidente de infecção (excepto otite média aguda) ao exame físico e que tiveram alta após uma primeira observação médica.[8] A maioria dos episódios de bacteriémia resolve-se espontaneamente, no entanto em cerca de 10% podem ocorrer complicações mais graves, como pneumonia, artrite séptica, osteomielite, meningite ou mesmo sépsis.[1, 5]

Nalgumas situações clínicas seleccionadas, pela sua gravidade e/ou pela idade ou ausência de focalização, é aconselhada investigação complementar que inclui a realização de hemocultura.[2] Apesar de apenas 5 a 15% das hemoculturas colhidas em crianças febris serem positivas, a identificação do microrganismo patogénico e as respectivas susceptibilidades aos antimicrobianos fornecem informação clínica importante, permitindo a utilização de terapêutica específica.[9] A monitorização destes dados, ao longo dos anos, permite um conhecimento adicional mais aprofundado, sobre a evolução epidemiológica e microbiológica dos gérmenes em causa, com as consequentes implicações terapêuticas.[2]

A introdução de novas vacinas conjugadas contra *Haemophilus infuenzae* tipo b (Hib) e vacinas pneumocócica heptavalente e meningocócica C diminuiu drasticamente a incidência de bacteriémia oculta e, como resultado, alterou a abordagem do pediatra perante uma criança febril.[7, 10]

Os objectivos principais do presente estudo foram analisar as hemoculturas positivas por microrganismos patogénicos no nosso Serviço de Urgência Pediátrica, ao longo de 4 anos e 6 meses, nomeadamente os agentes mais frequentes e respectiva susceptibilidade aos antimicrobianos, a sua evolução e correlação com a história clínica.

/ Métodos

Foi realizado um estudo longitudinal retrospectivo, descritivo, com base na análise de todas as hemoculturas colhidas, no Serviço de Urgência Pediátrica entre 1 de Janeiro de 2003 e 30 de Junho de 2007, em crianças febris, com idade inferior a 16 anos.

Através dos dados informáticos do Serviço de Patologia Clínica foi possível obter, para cada ano do estudo, o número total de hemoculturas pedidas e de microrganismos patogénicos identificados, assim como as respectivas susceptibilidades aos antimicrobianos. Foi considerado apenas um microrganismo por cada criança, no caso de ter havido mais do que uma cultura positiva no mesmo episódio febril.

Para o isolamento e caracterização dos diversos gérmenes e para o estudo das respectivas susceptibilidades aos antimicrobianos, foram utilizados métodos clássicos, padronizados internacionalmente, em uso no Serviço de Patologia Clínica do Hospital.

Os gérmenes considerados potencialmente patogénicos incluem: *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococus aureus, Escherichia coli, Salmonella spp, Brucella spp, Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae e Enterococcus faecalis.*

As variáveis analisadas foram: idade, sexo, ano da vinda ao Serviço de Urgência, diagnóstico e evolução.

O diagnóstico de bacteriémia foi considerado sempre que clinicamente as crianças apresentavam um estado geral conservado, sem sinais de choque ou púrpura e sem necessidade de preenchimento líquido particular, nem suporte inotrópico, mas em cujas hemoculturas foi identificado um microrganismo patogénico. Foi considerada leucocitose a presença de leucócitos superior a $15x10^9$/L e proteína C reactiva (PCR) positiva se esta foi superior a 5 mg/dL.

/ Resultados

Durante os anos do estudo, a população total de crianças admitidas no Serviço de Urgência Pediátrica foi de 142 760, variando de 28 860 a 35 574 (mediana de 30 322). Neste período foram pedidas 3264 hemoculturas (2.3%). A percentagem de colheitas por cada ano, em relação ao número de admissões, variou de 2.4% em 2003 a 2.6% na primeira metade do ano de 2007. Foram positivas 470 hemoculturas (14.4%), sendo 89 (2.7%) o número total de microrganismos patogénicos isolados, considerando-se nos restantes casos ter havido contaminação. A percentagem global de bactérias contaminantes em relação ao total de hemoculturas pedidas foi de 11.7%, sendo a maioria destes gérmenes *Staphylococcus* coagulase negativo (*S. epidermidis*).

A Tabela I representa os microrganismos patogénicos identificados ao longo dos anos do estudo. Os gérmenes patogénicos mais frequentemente isolados foram: *Streptococcus pneumoniae*



(27 casos; 30.4%), *Neisseria meningitidis* (14 casos; 15.7%), *Staphylococcus aureus* (12 casos; 13.5%), *Escherichia coli* (12 casos; 13.5%) e *Salmonella* (4 casos; 4.5%). Nas hemoculturas em que se isolou *Neisseria meningitidis* foi possível conhecer os serogrupos em metade das estirpes (7/14), 4 do serogrupo B e 3 do serogrupo C. Não foi possível ter acesso aos serotipos referentes ao *Streptococcus pneumoniae* isolados em hemocultura. Em relação ao estudo das susceptibilidades aos antimicrobianos, todas as estirpes de *Neisseria meningitidis* eram susceptíveis à penicilina. Relativamente às 27 estirpes de *S. pneumoniae*, 79% eram susceptíveis à penicilina, 3.7% tinha susceptibilidade intermédia, 11% eram resistentes e 6% eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração. Quanto ao *S. aureus* em 80% constatou-se resistência à penicilina e foi isolado um meticilino-resistente. A sua sensibilidade aos antimicrobianos foi de 80% para as cefalosporinas de 3.ª geração, nomeadamente o ceftriaxone. Verificou-se resistência à ampicilina em 62% das *E. coli* isoladas, mas a sensibilidade para as cefalosporinas de 2.ª e 3.ª geração foi de 100%.

Os diagnósticos finais correspondentes às infecções provocadas pelos 5 microrganismos mais frequentemente isolados estão indicados na Tabela II.

Após análise detalhada do estudo analítico (hemograma e proteína C reactiva) realizado aquando da colheita das hemoculturas constatou-se que 65% das crianças apresentavam leucocitose e/ou PCR elevada. O número de leucócitos variou de 2.4x10^9/L a 49.2x10^9/L (mediana de 18.1x10^9/L) e o valor do reagente de fase aguda (proteína C reactiva) variou de 0.1 mg/dL a 43.4 mg/dL (mediana de 8.9 mg/dL).

Quanto à situação vacinal, verificou-se que das 14 crianças com hemoculturas positivas por *N. meningitidis*, 4 tinham sido vacinadas com vacina meningocócica C, 8 crianças não tinham sido vacinadas e em 2 casos a situação vacinal era desconhecida. Apenas numa criança vacinada (2 doses de vacina meningocócica C) foi isolada *N. meningitidis* serogrupo C. Relativamente ao S. *pneumoniae* (27), 8 crianças apresentavam pelo menos uma dose da vacina pneumocócica heptavalente, 12 não tinham qualquer dose e em 5 casos a situação vacinal actual era desconhecida.

Após realização da hemocultura, 82 crianças iniciaram antibioterapia empírica. Atendendo à evolução clínica e à susceptibilidade aos antimicrobianos, foi necessário alterar o antibiótico em dois casos: *S.aureus* meticilino-resistente, tendo sido alterado o cefuroxime para a associação vancomicina + gentamicina

TABELA I- MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS IDENTIFICADOS EM HEMOCULTURA (2003-2007)

Bactérias	2003	2004	2005	2006	2007 (1ºsem)	Total
Streptococcus pneumoniae	5	8	7	5	2	27
Neisseria meningitidis	6	5 (Serogrupo C3 ; Serogrupo B1)	1 Serogrupo B2	2 Serogrupo B1	-	14
S.aureus	1	5	2	3	1	12
E. coli	3	4	2	3	-	12
Salmonella	-	-	2	2	-	4
Y. enterocolitica	-	3	-	-	-	3
H. influenzae	-	1	1	-	1	3
St. agalactiae	1			2		3
St. pyogenes	-	1	1	1	-	3
E. faecalis	-	-	1	1	-	2
K. pneumoniae	-	1				1
Nocardia					1	1
Acinetobacter baumanii	1					1
Proteus mirabilis				1		1
Serratia marcescens				1		1

e, no segundo caso, *S. pneumoniae*, em que a alteração foi de uma cefalosporina de segunda geração para uma de terceira geração.

Em relação à evolução final das crianças, duas faleceram de choque séptico por *N. meningitidis* e *S. pneumoniae,* respectivamente. No primeiro caso, tratava-se de um criança de 2 anos com quadro clínico de choque séptico com púrpura generalizada e com falência multiorgânica, que veio a falecer após a transferência para Hospital Central. O segundo caso diz respeito a uma criança de 9 anos que à admissão no Serviço de Urgência apresentava um quadro de choque séptico, com rápida evolução para paragem cardiorrespiratória irreversível.

Sete crianças com bacteriémias ocultas por S. *aureus* (3), S. *pneumoniae* (2), *Salmonella* (1) e *E. faecalis* (1) tiveram uma evolução clínica favorável, sem instituição de terapêutica antibiótica.

TABELA II - DIAGNÓSTICOS CORRESPONDENTES ÀS INFECÇÕES PROVOCADAS PELOS 5 MICRORGANISMOS MAIS FREQUENTEMENTE ISOLADOS

Bactérias	N.º total	Diagnósticos
St. pneumoniae	27	Bacterémia 13; Sépsis + Pneumonia 5 Sépsis + meningite 4; Pneumonia 3 Sépsis 1; Celulite periorbitária 1
N. meningitidis	14 (Serogrupo B – 4) Serogrupo C - 3)	Sépsis + meningite 8; Sépsis 5 Bacterémia 1
S. aureus	12	Bacterémia 6; Osteomielite 2; Pneumonia 2 Artrite 1; Pielonefrite aguda 1
E. coli	12	Pielonefrite aguda 10; Sépsis 1 Sínd. Hemolítico Urémico 1
Salmonella	4	Bacteriémia 3; Febre Tifóide 1

/ Discussão

A grande maioria dos estudos internacionais dedica-se à análise das hemoculturas, sobretudo no grupo etário dos 3 aos 36 meses de vida, principalmente em crianças com febre sem foco, pelo que esses dados não podem ser completamente comparados com os nossos resultados.[2, 6, 11] Um estudo nacional, publicado em 2007, aborda esta temática no Serviço de Urgência do Hospital Pediátrico de Coimbra[2] e outro estudo escocês publicado em 2003 pode também ser comparado com o nosso, pois o Serviço de Urgência apresenta características semelhantes, admitindo crianças até aos 15 anos de idade.[12]

Durante o período do estudo (4 anos e 6 meses), a percentagem de hemoculturas colhidas em relação ao total de admissões no Serviço de Urgência (2.3%) foi superior à percentagem obtida por Rodrigues F. *et al.* em 2007 (1.5%), mas francamente inferior ao estudo escocês de 2003 (7.2%), realizado durante 7 meses, envolvendo 15 938 crianças.[2, 12] Segundo os autores, o pedido de hemoculturas faz-se, na maioria dos hospitais, de modo muito mais liberal, em quase todas as crianças com febre.[12] Relativamente à percentagem de hemoculturas positivas do nosso estudo (2.7%) corresponde, nos dois artigos atrás mencionados, aos valores de 4.9% e 9.5%, respectivamente.[2, 12]

Quanto à percentagem de gérmenes contaminantes em relação ao total de hemoculturas pedidas, foi de 11.7% no presente estudo e no estudo escocês foi de 7.3%.[12] Nos artigos consultados que incluem crianças entre os 3 e os 36 meses de vida a percentagem é substancialmente inferior, variando de 1.2% a 2.1%.[13] Os *Staphylococcus coagulase* negativo constituíram, como para a maioria dos autores, os agentes contaminantes mais frequentes.[6, 13] Segundo Hall *et al.*[14], na tentativa de evitar o desconforto das crianças, a maioria dos centros pediátricos usa os cateteres endovenosos já existentes para a colheita da hemocultura, em vez da tradicional punção venosa periférica, assim como a colheita de uma única hemocultura, o que tem contribuído para as elevadas taxas de contaminação na idade pediátrica.

O *S. pneumoniae* e a *N. meningitidis* foram os microrganismos patogénicos predominantes, ocorrendo sobretudo em crianças com idade inferior a 36 meses, o que é concordante com outras séries.

No entanto, ainda foi isolado *H. influenzae* em 3 crianças, ao contrário do estudo do Hospital Pediátrico de Coimbra, em que a partir do ano 2000 não se verificaram isolamentos deste microrganismo.[2]

No presente trabalho, não foram encontradas estirpes de *N. meningitidis* resistentes à penicilina, e a quase totalidade dos *S. pneumoniae* eram susceptíveis ou apresentavam susceptibilidade intermédia à penicilina. Fazendo a correlação clínico-microbiológica, constata-se que para a *N. meningitidis* predominaram as formas de infecção grave: sépis ou sépsis associada a meningite, verificando-se um óbito. Para o *S. pneumoniae* predominaram situações mais benignas, tendo ocorrido também um óbito por choque séptico, situação semelhante descrita noutros estudos.[2]

O *S. aureus,* tal como noutros estudos, foi isolado principalmente em crianças com infecções osteo-articulares.[2] Dos casos em que foi isolada *E. coli*, 83% correspondiam a pielonefrites.

Ao longo dos últimos anos os microrganismos mais frequentemente isolados têm-se mantido relativamente estáveis assim como as suas susceptibilidades. A monitorização destes dados microbiológicos é muito importante em termos epidemiológicos e clínicos.

/ Bibliografia

1. Kuppermann N. "Occult bacteriemia in young febrile children". *Ped Clin N Amer.* 1999;46:1073-101.
2. Rodrigues F, Alves M, Alves A, Lemos L. "Hemoculturas positivas num Serviço de Urgência Pediátrica:1995-2005". *Acta Pediátrica Portuguesa.* 2007;38(2):69-72.
3. Pinheiro A. "Referenciação à Urgência Pediátrica do Hospital S. Teotónio - Viseu". *Rev Port Clin Geral.* 2008;24:671-8.
4. McCaig L, McDonald L, Cohen A, MJ K. "Increasing Blood Culture Use at US Hospital Emergency Department Visits, 2001 to 2004". *Annals of Emergency Medicine.* 2007;50(1):42-8.
5. Lee G, Harper M. "Risk of Bacteremia for Febrile Young Children in the Post--Haemophilus influenzae Type b Era". *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1998;152:624-8.
6. Scott M, Rubin L. "Incidence of Occult Bacteremia Among Higly Febrile Young Children in the Era of the Pneumococcal Conjugate Vaccine". *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2004;158:671-5.
7. Alpern ER, Alessandrini EA, Bell LM, Shaw KN, McGowan KL. "Occult bacteremia from a pediatric emergency department: current prevalence, time to detection, and outcome". *Pediatrics.* 2000 Sep;106(3):505-11.
8. Prince A. "Doenças Infecciosas". In: Behrman RE, Kliegman RM, editors. Nelson *Princípios de Pediatria.* 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabra Koogan S.A.; 2004. p. 324-38.
9. Reller L, Sexton D. "Blood cultures for the detection of bacteremia". In: Basow D, editor. *UpToDate Waltham, MA*: UpToDate; 2009.
10. Allen C. "Fever without a source in children 3 to 36 months of age". *UpToDate.* 2009.
11. Kaplan S, Mason E, Wald E, GE S, JS B, TQ T. "Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 Children`s Hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine". *Pediatrics.* 2004;113(443-9).
12. Leonard P, Beatle T. "How do blood cultures sent from a paediatric accident and emergency department influence subsequent clinical management?" *Emerg Med J.* 2003;20:347-8.
13. Herz AM, Greenhow TL, Alcantara J, Hansen J, Baxter RP, Black SB, et al. "Changing epidemiology of outpatient bacteremia in 3- to 36-month-old children after the introduction of the heptavalent-conjugated pneumococcal vaccine". *Pediatr Infect Dis J.* 2006 Apr;25(4):293-300.
14. Hall K, Lyman J. "Updated Review of Blood Culture Contamination". *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(4):788-802.

RPDI
Maio > Agosto 2010 / Vol. 6 > N.º 2

ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

Bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*

Importância clínica na terapêutica

Pseudomonas aeruginosa efflux pumps

Clinical relevance on therapy

/ C. Caneiras[1] / C. Marcos[1] / T. Ferreira[2] / T. Hanscheid[3] / J. Melo-Cristino[3] / A. Duarte[1]

[1] iMed, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa
[2] Laboratório de Microbiologia, Hospital S^to António dos Capuchos, Lisboa
[3] Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

Correspondência:

Aida Duarte
Laboratório de Microbiologia
Faculdade de Farmácia. Av. Forças Armadas
1649-019 Lisboa

Telefone: +351 21 7946440
Fax: +351 21 7934212

/ Resumo

As infecções severas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* têm assumido na última década um papel de destaque, dado tratar-se de um microrganismo de difícil erradicação e com elevada resistência intrínseca e adquirida. Em *P. aeruginosa* foram caracterizados sete sistemas de bombas de efluxo, os quais contribuem para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência às classes de antibióticos clinicamente mais relevantes. Dado que a terapêutica seleccionada pode actuar como indutora e originar eventos mutacionais que promovem a hiperexpressão das bombas de efluxo, o tratamento destas infecções constitui um grande desafio terapêutico e impõe um conhecimento actualizado desta temática. Esta revisão foi assim desenvolvida com o intuito de rever a contribuição da hiperexpressão dos sistemas de bombas de efluxo em *P. aeruginosa*, na multirresistência aos antibióticos. Pretendeu-se também avaliar a possibilidade da utilização destes sistemas como alvos terapêuticos de modo a restabelecer a susceptibilidade aos antibióticos disponíveis.

Palavras-chave: Bombas de Efluxo, Multirresistência, *Pseudomonas aeruginosa*.

/ Abstract

The severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa have taken over the last decade an important role because it is a micro-organism difficult to eradicate and presents high intrinsic and acquired resistance. In P. aeruginosa were characterized seven systems of efflux pumps, which have a significant role in the development of multidrug resistance phenotypes to clinically more relevant classes of antibiotics. Since the selected therapy may act to induce and lead to mutational events that promote the overexpression of efflux pumps, the treatment of these infections is a major therapeutic challenge and requires an updated knowledge of this subject. This review was developed with the aim of reviewing the contribution of overexpression systems for efflux pumps in P. aeruginosa, in multidrug resistance to antibiotics. Intention was also to evaluate the possibility of using these systems as therapeutic targets in order to restore the susceptibility to antibiotics available.

Key-words: *Efflux pumps, Multidrug resistance, Pseudomonas aeruginosa.*



/ Introdução

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria de Gram negativo frequentemente isolada em infecções associadas aos cuidados de saúde, nomeadamente em pneumonias, infecções do tracto urinário e bacteriémias, associada a elevados valores de mortalidade e morbilidade (27-48%)[1]. Particularmente frequente em unidades de cuidados intensivos[2], é uma bactéria de difícil erradicação, cujas infecções estão associadas a um elevado nível de resistência intrínseca e adquirida[3].

Em Portugal são escassos os dados bibliográficos de âmbito epidemiológico, clínico e microbiológico. Em 1999, Hanberger *et al.* compararam isolados de unidades de cuidados intensivos de cinco países da União Europeia, e verificaram que Portugal era o país em que este patógeneo era mais frequentemente isolado e apresentava maior percentagem de resistência aos antimicrobianos[4]. Em 2007, Cardoso *et al.*, num estudo que compreendeu 1009 isolados de *P. aeruginosa* de diferentes serviços hospitalares e da comunidade, descrevem uma multirresistência em 9,1% dos isolados, em que 20% destes apresentavam resistência a todos os antibióticos estudados (piperacilina/tazobactam, ceftazidima, imipenemo, meropenemo, ciprofloxacina, amicacina e gentamicina)[5].

Estudos recentes sugerem que a hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo se encontra maioritariamente envolvida nos fenómenos de multirresistência, dada a sua habilidade de expulsão dos antimicrobianos da célula bacteriana[1]. Podem actuar isoladamente ou em sinergia com outros mecanismos: diminuição da permeabilidade da membrana externa[6], produção de enzimas hidrolíticas ou modificação de alvos terapêuticos[7].

/ Bombas de efluxo em *P. aeruginosa*

As infecções por *P. aeruginosa* são normalmente tratadas com ceftazidima, ciprofloxacina, imipenemo, gentamicina, tobramicina, ticarcilina-clavulanato, ou piperacilina-tazobactam em combinação ou isoladamente. Alguns destes antibióticos são substratos para as bombas de efluxo. Em *P. aeruginosa* foram caracterizados sete sistemas de bombas de efluxo[8], os quais têm contribuído para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência às classes de antibióticos clinicamente mais relevantes: fluoroquinolonas, *β*-lactâmicos e aminoglicosídeos[1].

A sequenciação do genoma da *P. aeruginosa* demonstrou a existência de genes que codificam para doze presumíveis transportadores RND (resistance-nodulation-division)[9]. No entanto, até ao momento, foram apenas caracterizados sete sistemas de bombas de efluxo: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexGHI-OpmD, MexJK e MexVW[10]. Estes apresentam uma organização estrutural tripartida que permite a expulsão rápida e directa de substractos para o ambiente extracelular[1], acção que pode desencadear a diminuição da susceptibilidade aos antibióticos pela hiperexpressão destes sistemas[1, 9, 11].

A regulação das bombas de efluxo do tipo Mex em *P.aeruginosa* é complexa e estabelecida por uma cascata hierárquica de regulação[8]. Adewoye *et al.* sugerem que mutações pontuais no gene *mexR*, gene regulador do operão de efluxo do sistema MexAB-OprM, poderão originar a rotura do sistema das bombas de efluxo e consequentemente um aumento da susceptibilidade aos antibióticos[12]. Estes estudos encontram-se em concordância com outros[13], embora a evidência da hiperexpressão destes sistemas proteicos na resistência a *P. aeruginosa* tenha essencialmente sido obtida por mutantes laboratoriais. Lomovskaya *et al.* descrevem que mutações nas bombas de efluxo Mex-AB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN promovem uma redução da concentração mínima inibitória (CMI) aos antibióticos da classe das fluoroquinolonas (CMI=0,25 µg/mL para <0,02µg/mL). Simultaneamente, verificaram uma diminuição da taxa de mutação de $2x10^{-7}$ para $<10^{-11}$ nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV[14], também responsáveis pela diminuição da susceptibilidade às fluoroquinolonas. Os antimicrobianos podem actuar como indutores e originar eventos mutacionais que promovem a hiperexpressão das bombas de efluxo, hipótese defendida por vários autores em que a exposição a concentrações subterapêuticas de antibióticos apresenta como consequência a selecção de estirpes mutantes[8, 15]. Estes resultados realçam a importância de monitorização farmacocinética da terapêutica, embora estudos adicionais devam ocorrer em contexto clínico e com maior número de isolados.

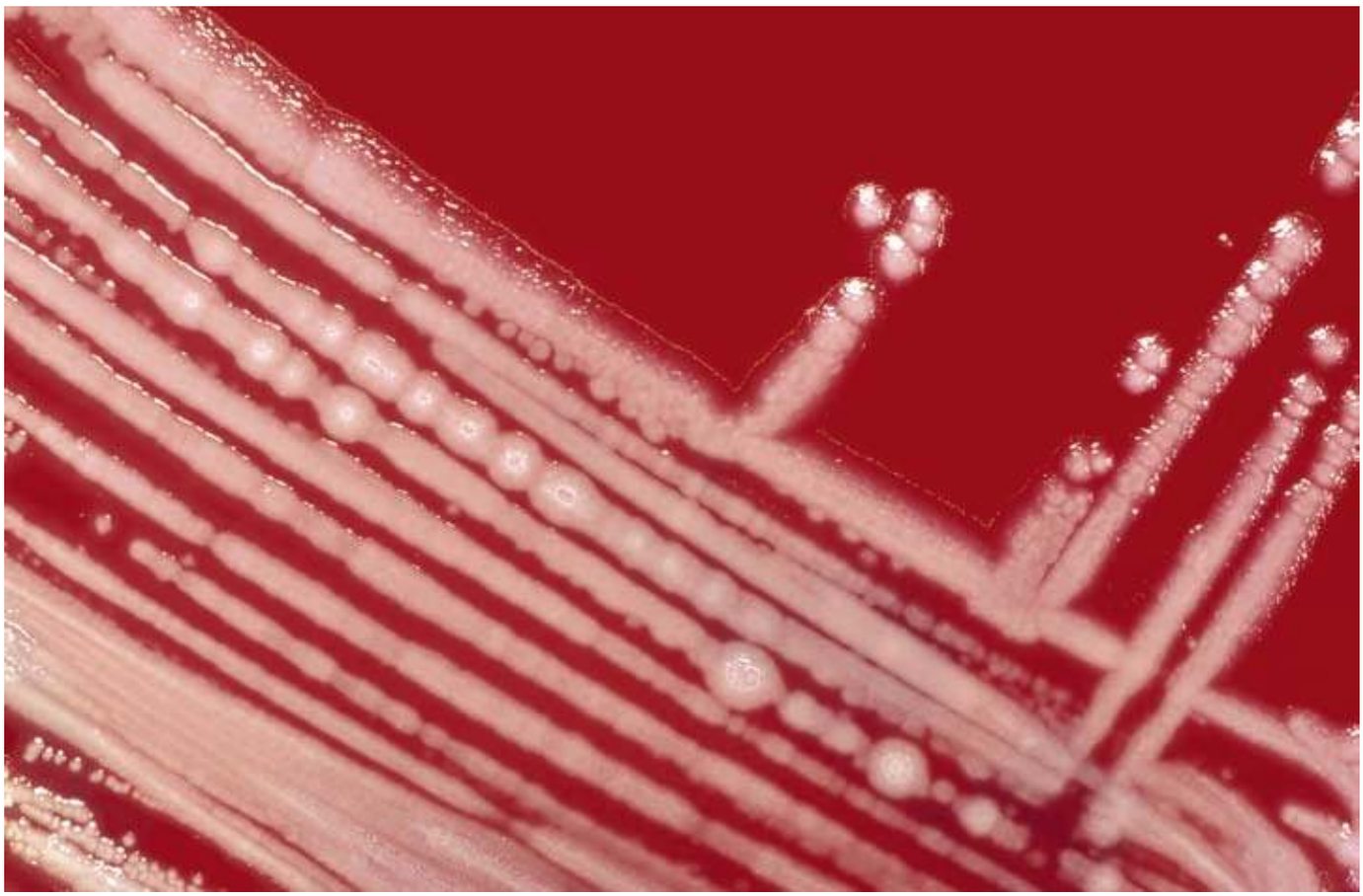
/ Fenótipo de multirresistência

A bomba de efluxo MexAB-OprM confere resistência basal a ß-lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, trimetoprim e sulfametoxazole[13]. Também a indução do sistema MexXY por aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrólidos, aumenta a expressão da porina OprM[16], promovendo a resistência a estes agentes antimicrobianos[10]. Assim, diferentes transportadores reconhecem diferentes classes de antibióticos pelo que, quando expressos simultâneamente[17], podem originar resistência cruzada[1, 18]. Apesar da existência de especificidade no reconhecimento do substracto pela bomba de efluxo[18], algumas têm as fluoroquinolonas como substracto principal. Masuda *et al.* estudaram estirpes mutantes de *P.aeruginosa* PAO1 que apresentavam alteração dos sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexXY. A rotura da proteína OprM do sistema MexAB promoveu uma diminuição da concentração mínima inibitória da ciprofloxacina (CMI=0,008µg/mL) comparativamente à estirpe *wild type* PAO1 (CMI=0,12µg/mL). Por sua vez, a hiperexpressão do sistema MexAB-OprM aumentou a CMI da ciprofloxacina para 0,25 µg/mL, o que veio confirmar que o aumento da expressão deste sistema pode estar na origem de fenótipos de resistência[18]. Também Llanes *et al.*, descreveram que a existência de mutações em MexAB-OprM e MexXY (CMI=8-16µg/mL) torna os isolados clínicos mais resistentes à cefepime (cefalosporina de 4.ª geração) com valores de CMI entre 8 e 16µg/mL, enquanto nos mutantes que apenas hiperexpressam um dos sistemas a CMI decresceu para 4µg/mL[17]. Os resultados podem ser de difícil interpretação, uma vez que nem sempre os valores das CMIs são clinicamente significativos.

/ Prevalência em isolados clínicos

A emergência de hiperexpressão das bombas de efluxo em isolados clínicos com fenótipo de multirresistência tem sido documentada por vários autores[1, 13, 17]. Ziha-Zarifi *et al.* estudaram 11 isolados multirresistentes que emergiram durante a terapêutica, demonstrando a hiperexpressão do sistema MexAB-OprM através da análise da expressão da OprM e de mutações no gene *mexR*[19]. Oh *et al.* referem que 17 de 20 isolados hiperexpressam quatro sistemas[14], enquanto Wolter *et al.* descrevem que 6 de 7 isolados resistentes à gentamicina hiperexpressavam o sistema MexXY[20]. Apesar do limitado número de estudos *in vivo* e da reduzida amostra, estes dados sugerem que a resistência em isolados clínicos pode estar associada à hiperexpressão de uma ou mais bombas de efluxo.

Em Portugal, embora a presença de bombas de efluxo em isolados clínicos provenientes de hospitais portugueses não tenha sido documentada, a expressão de metalo-*ß*-lactamases não têm sido prevalente, nomeadamente VIM-2 [21] e IMP-5 [22] relativamente ao número total de estirpes multirresistentes identificadas em unidades hospitalares. Do estudo efectuado no Hospital de S.to António dos Capuchos, durante quatro anos, apenas 9% dos isolados de *Pseudomonas* spp. eram produtores da enzima metalo--*ß*-lactamase VIM-2, enquanto em 76% das estirpes com resistência às oximinocefalosporinas (cefalosporinas de 3.ª geração), imipenemo, meropenemo e ciprofloxacina, não foi identificada a presença de genes codificantes para *ß*-lactamases de espectro alargado (ESBLs) e/ou metalo- *ß*-lactamases. No entanto, nestas estirpes verificou-se um aumento da susceptibilidade à ciprofloxacina, na presença do composto naftilamida fenilalanina arginina (Pa*ß*N), o qual potencia a actividade das fluorquinolonas como inibidor de bombas de efluxo. Também, Kriengkauykiat *et al.* utilizaram Pa*ß*N, como potenciador da actividade da levofloxacina, e verificaram que a prevalência do fenótipo de hiperexpressão decresceu na presença do inibidor e foi mais prevalente nas estirpes resistentes à levofloxacina e em frequência variável entre 27 e 86% nas estirpes com resistência cruzada a outros antibióticos. O inibidor reduziu 16 vezes o valor da CMI para a levofloxacina nas estirpes em que a CMI era de 128 µg/mL[23]. Num estudo recente, Tohidpour *et al.* verificaram que o aumento da expressão de bomba de efluxo estava



presente em 35% dos isolados resistentes às fluoroquinolonas, e em frequência variável nos isolados com resistência cruzada a outros antimicrobianos: gentamicina (31%), ceftazidima (29%) e imipenemo (18%). Em conjunto, estes resultados indicam que o PAβN poderá ser eficaz em procedimentos clínicos para restaurar a susceptibilidade às fluoroquinolonas[24].

/ Terapêutica antimicrobiana

A terapêutica antimicrobiana é usualmente empírica, tendo em conta a susceptibilidade local do microrganismo, e inclui as classes das fluoroquinolonas, β-lactâmicos e aminoglicosídeos, em monoterapia ou em terapêutica combinada[18]. A associação de um β-lactâmico com um inibidor das β-lactamases, como a piperacilina/tazobactam (PIP/TAZ), é também uma opção amplamente utilizada[1].

Lodise *et al.* estudaram isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes em 351 doentes com infecções do tracto respiratório. Os autores verificaram que 48,1% dos isolados tinham tido exposição prévia a antimicrobianos e que a terapêutica com carbapenemos (≥3 dias) e fluoroquinolonas (4 dias) se associava a um desenvolvimento mais rápido da resistência, enquanto a terpêutica com PIP/TAZ (≥12 dias) retardou o aparecimento de microrganismos resistentes[3]. Segundo Vicent *et al.* a PIP/TAZ é um fármaco com grande potencial no tratamento de *Pseudomonas* spp. multirresistentes dado o elevado valor de susceptibilidade a este antimicrobiano (83%). No entanto, alertam para a possibilidade de selecção de isolados com resistência intermédia e para a revisão de protocolos terapêuticos, assim como dos critérios de interpretação da concentração mínima inibitória para a piperacilina/tazobactam[25].

/ Novas abordagens terapêuticas

Considerando os antibióticos aprovados pela FDA de 1998 até 2005, verifica-se que, de forma comum, a maioria apresenta baixa actividade em *P. aeruginosa* [11]. A tigeciclina foi desenvolvida considerando as resistências dos seus antecessores estruturais, nomeadamente a sua expulsão pelo sistema de efluxo Tet[1], sendo no entanto reconhecida pelo sistema MexXY-OprM [26].

A utilização clínica de inibidores de bombas de efluxo que actuem em sinergia com o antibiótico parece ser promissora[11]. Lomovskaya, *et al.* estudaram a potenciação do efeito da levofloxacina, substracto de quatro sistemas de bombas de efluxo. Dos 200.000 compostos naturais e sintéticos estudados foi identificado o MC-207,110, que aumentou 64 vezes a susceptibilidade à levofloxacina, comparativamente à estirpe *wild type*[15]. Apesar de

terem sido descritos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos desfavoráveis[11] os estudos permitiram o desenvolvimento de compostos análogos, com propriedades optimizadas[9].
O desenvolvimento de novos compostos requer um conhecimento exaustivo das bombas de efluxo, de modo a permitir a inibição simultânea das bombas e uma acção selectiva na célula procariota.

/ Conclusão

As infecções severas causadas por *P. aeruginosa* têm assumido na última década um papel de destaque. A sua elevada resistência intrínseca e adquirida parece ser maioritariamente causada por sistemas de efluxo.

Isolados clínicos com hiperexpressão destas bombas apresentam sérios desafios terapêuticos, devendo a terapêutica administrada ser adequada a esta nova realidade. É imperativo o conhecimento dos microorganismos existentes nas unidades hospitalares, nomeadamente o seu ambiente genético e perfil de susceptibilidade, assim como a promoção da importância de monitorização farmacocinética da terapêutica em doentes mais susceptíveis.

Impõe-se a necessidade de desenvolver novas estratégias alternativas, como a utilização clínica de inibidores de bombas de efluxo. A investigação nesta área deve ser promovida, dado que estudos *in vitro* sugerem que a inibição efectiva das bomba de efluxo pode resultar em hipersensibilização da *Pseudomonas aeruginosa* a níveis de reconhecida eficácia, podendo também inferferir no retardamento do desenvolvimento de novas resistências.

/ Bibliografia

1. Poole K. "Efflux-mediated antimicrobial resistance". *J Antimicrob Chemother* 2005;56(1):20-51.
2. Strateva T, Yordanov D. "*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance". *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 9):1133-48.
3. Lodise TP, Miller CD, Graves J, et al. "Clinical prediction tool to identify patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections at greatest risk for multidrug resistance". *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(2):417-22.
4. Hanberger H, J. A. Garcia-Rodriguez, M. Gobernado, H. Goossens, L. E. Nilsson, and M. J. Struelens. "Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups". *Jama* 1999;281:67-71.
5. Cardoso O, Alves AF, Leitao R. "Surveillance of antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from a central hospital in Portugal". *J Antimicrob Chemother* 2007;60(2):452-4.
6. Li XZ, L. Zhang, and K. Poole. "Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*". *J Antimicrob Chemother* 2000;45:433-6.
7. Deplano A, Denis O, Poirel L, et al. "Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*". *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1198-204.
8. Piddock LJ. "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria". *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):382-402.
9. Lynch AS. "Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view". *Biochem Pharmacol* 2006;71(7):949-56.
10. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plesiat P. "Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(4):1347-51.
11. Lomovskaya O, and K. A. Bostian. "Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use". *Biochemical Pharmacology* 2006;71:910-8.
12. Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. "The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity". *J Bacteriol* 2002;184(15):4308-12.
13. Srikumar R, Paul CJ, Poole K. "Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*". *J Bacteriol* 2000;182(5):1410-4.
14. Lomovskaya O, A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M. S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, and V. J. Lee. "Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1340-6.
15. Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretlind B. "Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains". *Microb Drug Resist* 2003;9(4):323-8.
16. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. "Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(9):2242-6.
17. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. "Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously". *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(5):1797-802.
18. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. "Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(12):3322-7.
19. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. "In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM". *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(2):287-91.
20. Wolter DJ, Smith-Moland E, Goering RV, Hanson ND, Lister PD. "Multidrug resistance associated with mexXY expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital". *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50(1):43-50.
21. Cardoso O, Leitão R, Figueiredo A, Sousa JC, Duarte A, Peixe LV. "Metallo-beta--lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal". *Microb Drug Resist.* 2002 Summer;8(2):93-7.
22. Brízio A, Conceição T, Pimentel M, Da Silva G, Duarte A. "High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006; 27: 27–31.
23. Kriengkauykiat J, E. Porter, O. Lomovskaya, and A. Wong-Beringer. "Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:565-70.
24. Tohidpour A, Peerayeh NS, Jalil FM, Hadi RY. "Determination of the Efflux Pump-Mediated Resistance Prevalence in *Pseudomonas aeruginosa*, Using an Efflux Pump Inhibitor". *Current Microbiology* 2009;59(3):352-355.
25. Vincent JL. "Microbial resistance: lessons from the EPIC study. European Prevalence of Infection". *Intensive Care Med* 2000;26 Suppl 1:S3-8.
26. Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum PE, Bradford PA. "Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1". *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(3):972-8.

RPDI
Maio > Agosto 2010 / Vol. 6 > N.º 2

CASO CLÍNICO / *CLINICAL CASE*

Tuberculose Pancreática

A propósito de um caso clínico

Pancreatic Tuberculosis

A clinical case report

/ **M. Barbedo**[1] / **A. Castro**[2] / **C. Pinto**[3] / **M. Mota**[3] / **J. Valente**[4]

[1] Interna Complementar de Medicina Interna
[2] Interna Complementar de Pneumologia
[3] Assistente Hospitalar Graduada de Medicina Interna
[4] Director de Serviço

Serviço de Medicina Interna Interna
Centro Hospitalar Gaia/Espinho EPE

Correspondência:

Marta Susana Machado Barbedo de Oliveira
Rua Vitorino Nemésio, 92
4435-475 Rio Tinto

Telemóvel: 96 6192615
Fax: 22 7830209
e-mail: marta_barbedo@hotmail.com

/ Resumo

A tuberculose pancreática é uma entidade rara e representa um desafio diagnóstico. As manifestações clínicas são inespecíficas e imagiologicamente assemelha-se a neoplasias ou pancreatite. A biopsia aspirativa guiada por ecografia ou por tomografia axial computorizada pode revelar necrose caseosa e presença de bacilos ácido-álcool resistentes com a coloração de Ziehl-Neelsen.
Os autores apresentam um caso clínico duma doente de 54 anos com tuberculose pancreática a mimetizar pseudoquisto pancreático. O diagnóstico foi confirmado pela identificação de *Mycobacterium tuberculosis* no exame microbiológico do produto obtido por biopsia aspirativa guiada por tomografia axial computorizada.
A tuberculose deve ser incluída nos diagnósticos diferenciais das massas pancreáticas, especialmente em doentes de países em desenvolvimento.

Palavras-chave: Tuberculose pancreática, *Mycobacterium tuberculosis*, massas pancreáticas

/ Abstract

Pancreatic tuberculosis is extremely unusual and the diagnosis of this entity is challenge. Clinical manifestations are usually non-specific, while the imaging features often mistaken malignancy and pancreatitis. Ultrasound or Computed Tomography-guided fine needle aspiration cytology may show caseation necrosis or the presence of acid-fast bacilli on Ziehl-Neelsen staining.
The authors present the case of a 54-year-old female with pancreatic tuberculosis mimicking pseudocyst. The diagnosis was confirmed by identification of Mycobacterium tuberculosis in cultured samples obtained by Computed Tomography-guided fine needle aspiration.
Tuberculosis should be included in the differential diagnosis of pancreatic masses, especially for people in developing countries.

Key-words: *Pancreatic tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, pancreatic masses*

/ Introdução

A tuberculose continua a ser um grave problema de saúde pública. Anualmente ocorrem 9 milhões de novos casos de tuberculose mundialmente e 1,5 milhões destes evoluem para a morte. A Europa é o continente com piores índices de diagnóstico e de cura, depois da África. Em Portugal, a incidência de novos casos é de 25,3/100.000[1]. Apesar da tendência para diminuição, Portugal é o país da União Europeia com maior taxa de incidência da doença, sendo esta cerca de três vezes maior que a média europeia[1].

Não obstante esta elevada incidência, o envolvimento pancreático é raro, principalmente em doentes imunocompetentes, estando descrita na literatura uma incidência de aproximadamente 4,7% de todos os casos de tuberculose[2, 3]. Num estudo de 1656 autópsias de doentes com tuberculose, apenas 14 tinham envolvimento pancreático[2]. Num estudo indiano de análise *post mortem* de 300 doentes com tuberculose disseminada, nenhum apresentava envolvimento pancreático[3].

A baixa incidência de tuberculose pancreática é explicada pela protecção conferida pelas enzimas pancreáticas que inactivam o *Mycobacterium tuberculosis* [4, 5, 6].

Os mecanismos de infecção pancreática pelo bacilo de Kock (BK) são: disseminação hematogénica, disseminação linfática, disseminação por contiguidade de órgãos adjacentes, ingestão de material infectado duma lesão pulmonar activa, reactivação de tuberculose latente num foco pancreático e reacção tóxico-alérgica pancreática com uma resposta inflamatória a antigénios das micobactérias[7].

A maioria da literatura médica sobre tuberculose pancreática está limitada a casos clínicos e a pequenas séries de casos oriundos de países endémicos, na sua maioria diagnosticados no decorrer de laparatomias de exérese de presumíveis carcinomas pancreáticos que posteriormente revelaram tratar-se de tuberculose pancreática[8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. O reconhecimento desta entidade reveste-se de grande importância dado a existência de terapêutica médica curativa[14, 19].

/ Caso clínico

Doente do sexo feminino, 54 anos, emigrante em França até aos dois meses prévios à admissão, altura em que regressou a Portugal.

Recorreu ao Serviço de Urgência (SU) por quadro com dois meses de evolução de início insidioso e agravamento progressivo de dor peri-umbilical sem irradiação e sem factores de alívio ou agravantes, associadamente a náuseas e vómitos alimentares (aproximadamente quatro vezes por semana). Referência a sintomatologia geral caracterizada por febre (38ºC) de predomínio vespertino, astenia, anorexia e emagrecimento de 20% do peso em dois meses. Negava qualquer outra sintomatologia, nomeadamente alteração do trânsito intestinal, queixas respiratórias, urinárias, cardiovasculares ou neurológicas.

Dos antecedentes pessoais destacava-se história de internamento em França três meses antes da admissão cuja informação clínica não foi disponibilizada e a doente sabendo apenas referir que teria sido internada com o diagnóstico de pancreatite aguda (quadro com três dias de evolução de dor epigástrica em barra e vómitos), tendo realizado biopsia pancreática que foi inconclusiva. Segundo a doente, o internamento teve três semanas de duração, tendo tido alta assintomática e sem necessidade de medicação em ambulatório. No que diz respeito aos antecedentes pessoais, de salientar ainda hábitos alcoólicos moderados desde os 35 anos de idade até à data do internamento anteriormente referido, altura em que interrompeu ingestão de álcool. Negava outros antecedentes pessoais ou familiares relevantes.

Ao exame objectivo no SU a doente encontrava-se febril (38,2ºC), hipotensa (TA: 87/52mmHg), taquicárdica (120bpm), polipneica (22cpm), com saturações periféricas



Figura 1 — Ecografia abdominal - heterogeneidade pancreática compatível com pancreatite crónica e presença de quisto na cauda sugestivo de pseudoquisto pancreático.

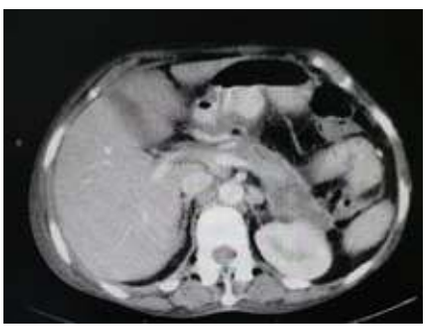


Figura 2 — TAC abdominal - colecção fluida na região do corpo e cauda do pâncreas com 57 x 23 x 55mm de maiores diâmetros, de paredes captantes com pequena quantidade de gás sugestiva de abcesso pancreático.

de oxigénio a ar ambiente de 97%, consciente, colaborante, orientada. Apresentava palidez da pele e mucosas. A auscultação cardíaca era rítmica, taquicárdica, sem sopros. À auscultação pulmonar apresentava murmúrio vesicular presente e simétrico, sem sons adventícios. O abdómen era mole e depressível, doloroso à palpação profunda do epigastro, sem sinais de irritação peritoneal, sem massas ou organomegalias palpáveis, os ruídos hidroaéreos estavam presentes e tinham normal sonoridade. Não se palpavam adenomegalias nas cadeias ganglionares cervicais, axilares ou inguinais. Ausência de edemas dos membros inferiores. Restante exame objectivo sem alterações.

Do estudo realizado de referir: anemia normocítica, hipocrómica; leucocitose com neutrofilia e monocitose; função renal, ionograma, enzimas de citólise e colestase hepáticas e amilase normais. Hipoalbuminemia; estudo da coagulação sem alterações. Sedimento urinário dentro dos parâmetros da normalidade. Gasimetria arterial sem insuficiência respiratória ou alterações metabólicas. Telerradiografia pulmonar sem lesões pleuroparenquimatosas.

Realizou ecografia abdominal que revelou heterogeneidade pancreática compatível com pancreatite crónica e presença de quisto na cauda, sugestivo de pseudoquisto pancreático (Figura 1).

Com o objectivo de melhor esclarecimento da imagem quística realizou Tomografia Axial Computorizada (TAC) abdominal que mostrou uma colecção fluida na região do corpo e cauda do pâncreas com 57 x 23 x 55mm de maiores diâmetros, de paredes captantes com pequena quantidade de gás, sugestiva de abcesso pancreático (Figura 2).

Foi submetida a drenagem percutânea guiada por TAC, tendo sido aspirado 20cc de líquido purulento (Figura 3) e colocado dreno.

O exame microbiológico do líquido identificou bacilos ácido-álcool resistentes no exame directo com coloração de Ziehl-Neelsen; *Mycobacterium tuberculosis complex* sensível a todos os anti-bacilares no exame cultural. Identificação de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* por Polymerase Chain Reaction (PCR). O exame microbiológico do mesmo líquido revelou *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* sensível aos carbapenems e aos aminoglicosídeos. A citologia do líquido foi negativa para células neoplásicas.

O estudo microbiológico da urina mostrou *Mycobacterium tuberculosis* com as mesmas sensibilidades do isolado no pâncreas. A pesquisa de BK no sangue, fezes, suco gástrico e lavado broncoalveolar (LBA) foi negativa.

As hemoculturas, urocultura, microbiológicos de LBA, coproculturas, parasitológico de fezes e marcadores víricos (VIH, VHB, VHC) foram negativos. Realizou ecocardiograma transesofágico que não revelou vegetações.

Iniciou terapêutica quadrupla com anti-bacilares (rifampicina 600mg, pirazinamida 1500mg, isoniazida 300mg e etambutol 1000mg/dia) e antibioterapia de largo espectro (vancomicina 1g de 12/12h e imipenem 500mg de 6/6h).

Manteve o dreno durante 5 dias, altura em que foi retirado por ausência de drenagem e por resolução radiológica com desaparecimento da colecção pancreática.

Verificou-se melhoria progressiva durante as primeiras 3 semanas de terapêutica. Após essa data constatou-se agravamento clínico com reinício de febre, dor abdominal refractária a analgesia, vómitos e sinais de abdómen agudo ao exame objectivo. Associadamente verificou-se agravamento analítico com aumento dos marcadores inflamatórios, amilase e enzimas hepáticas (em especial enzimas de colestase hepática) (Quadro I).

Repetiu TAC abdominal (Figura 4) que mostrou pâncreas heterogéneo com um aspecto globoso da região cefálica com áreas de hipodensidade sugestivas de pancreatite necrohemorrágica e colecções, as mais evidentes no processo uncinado com cerca de 2cm x 1,5cm e na cauda com cerca de 4cm x 1,5cm, esta última estendendo-se aos planos adiposos peri-pancreáticos e ao ligamento gastro-esplénico; densificação dos planos adiposos peri-pancreáticos por edema/processo inflamatório; vesícula biliar distendida, sem espessamento da parede, via biliar principal ectasiada.

Foi submetida a laparotomia exploradora tendo-se constatado adesividade das ansas e epiplon ao peritoneu, pâncreas tumefacto, endurecido em toda a sua extensão, pâncreas com necrose gorda, sem colecções purulentas passíveis de serem drenadas, aderente à parede posterior do estômago, DII espessada e dilatada, condicionada pelo aumento da região cefálica pancreática, imagens

sugestivas de tuberculose miliar dispersas por todas as ansas do delgado, cólon e grande epiplon; efectuada colheita de epiplon para exame; realizada lavagem e drenagem da cavidade abdominal com colocação de 2 drenos microtubulares em ambas as goteiras, abrangendo o fundo de saco de Douglas e a retrocavidade dos epiplons.

O exame microbiológico do epiplon revelou presença de *Mycobacterium tuberculosis*.

A doente foi transferida para a Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente com o diagnóstico de choque séptico grave com ponto de partida abdominal. Perante o aumento das enzimas de colestase e citólise hepáticas, realizou biopsia hepática no sentido de estabelecimento do diagnóstico diferencial entre hepatite tuberculosa ou medicamentosa. A biopsia foi a favor de hepatite medicamentosa; pesquisa de BK negativa. Alterada terapêutica anti-bacilar para linezolide, levofloxacina, amicacina e etambutol. Apesar das medidas instituídas apresentou uma evolução desfavorável vindo a falecer na 3.ª semana pós-operatória.

/ Discussão

O abcesso pancreático é uma complicação incomum da pancreatite aguda e crónica, ocorrendo em aproximadamente 4% dos casos. As bactérias mais frequentemente isoladas nesses abcessos são: *Echerichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Pseudomonas spp., Streptococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*[20]. O isolamento de *Mycobacterium tuberculosis* em abcesso pancreático é raro[21, 22]. Nesta doente, coloca-se como hipótese fisiopatológica mais provável, a presença de tuberculose pancreática superinfectada iatrogenicamente no internamento prévio durante o acto da biopsia ou por disseminação hematogénica. Na realidade o *Staphylococcus aureus meticilino resistente* é um agente associado a infecções hospitalares sendo muito raro como agente da comunidade. Persistem dúvidas em relação ao mecanismo de atingimento pancreático pelo BK. Dado ter sido isolado BK no exsudado do abcesso pancreático, urina e epiplon, acreditamos estar na presença de tuberculose disseminada com envolvimento pancreático por disseminação linfohematológica[2, 3, 9]. Estão descritos casos na literatura de associação do alcoolismo com tuberculose pancreática[22]. A explicação mais plausível é que o alcoolismo cause alterações estruturais pancreáticas diminuindo a protecção deste órgão conferido pelas enzimas pancreáticas.

A tuberculose pancreática afecta igualmente ambos os sexos[23], sendo mais frequente em jovens (idade média: 31 anos), com história de tuberculose no passado e residente em zonas endémicas[14]. A apresentação clínica típica caracteriza-se por dor abdominal (75%), emagrecimento (69%) e febre (50%). Sintomatologia menos frequente inclui anorexia, astenia, icterícia obstrutiva e anemia ferripriva[8, 21, 24]. As alterações analíticas mais frequentes incluem anemia, linfopenia, elevação da velocidade de sedimentação, transaminases e fosfatase alcalina[8]. A doente apresentada neste caso clínico apresentava um quadro clínico e analítico coincidente com o descrito na literatura. No entanto, todas esta características são inespecíficas podendo ocorrer em outras patologias de maior prevalência, pelo que o diagnóstico requer elevado nível de suspeição.

Imagiologicamente, a tuberculose pancreática traduz-se na TAC por lesão de bordos irregulares com captação periférica de contraste de localização preferencial na cabeça do pâncreas e podendo ser acompanhada por adenopatias peripancreáticas[25]. Nagar *et al.*, reviu 32 doentes com tuberculose pancreática; a ecografia revelou em 27 doentes colecções hipoecoicas e em 5 doentes mostrou heterogeneidade pancreática; a TAC revelou em 29 doentes colecções hipodensas e adenopatia peripancreática, e em 3 doentes mostrou lesões complexas pancreáticas[9, 26, 27]. Nenhuma destas alterações imagiológicas é patognomónica, podendo assumir uma variedade de manifestações radiológicas de difícil tradução. Neste caso clínico, a ecografia foi sugestiva de pseudo-quisto, tendo sido a TAC,

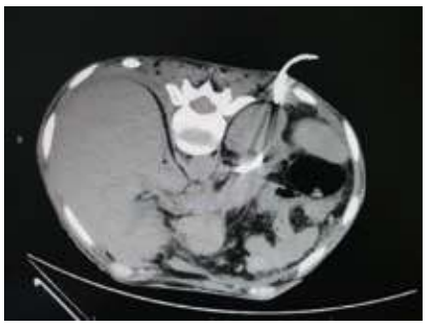


Figura 3 — Drenagem percutânea guiada por TAC.

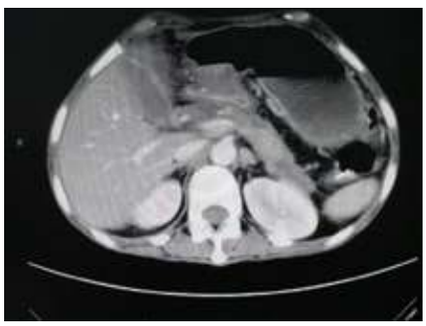
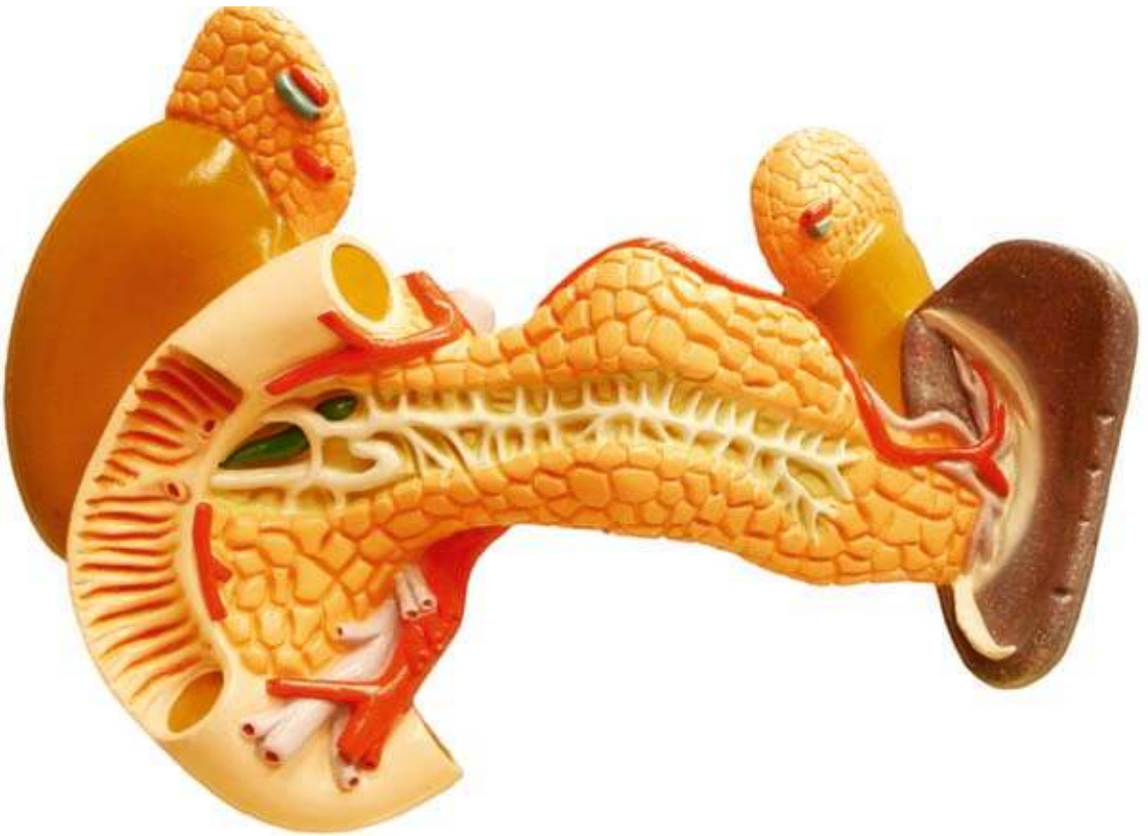


Figura 4 — TAC abdominal - pâncreas heterogéneo com um aspecto globoso da região cefálica com áreas de hipodensidade sugestivas de pancreatite necro-hemorrágica e colecções sugestivas de abcessos.

o exame imagiológico mais esclarecedor, revelando uma colecção fluida sugestiva de abcesso de localização pouco usual (cauda).

O diagnóstico definitivo é conseguido pela demonstração no tecido da lesão de granulomas caseosos, bacilos ácido-álcool resistentes com a coloração de Ziehl-Neelsen ou pela presença de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR. A biopsia da lesão revela granulomas em 60% dos casos. A coloração com Ziehl-Neelsen é rápida e simples, mas apenas tem sensibilidade de 50%. Os exames culturais são mais sensíveis (77%), têm a vantagem de fornecer informação sobre as sensibilidades aos anti-bacilares, mas têm a grande desvantagem de serem morosas podendo atrasar o diagnóstico[4]. A PCR permite uma resposta no próprio dia, tem uma sensibilidade de 77%, mas podem ocorrer falsos negativos[28]. No caso clínico apresentado, o diagnóstico definitivo foi realizado pela identificação



de DNA no *Mycobacterium tuberculosis*, de bacilos ácido-álcool resistentes ao exame directo e de *Mycobacterium tuberculosis* sensível a todos os anti-bacilares no exame cultural.

As técnicas mais frequentemente usadas para obtenção de tecido para estudo incluem: biopsia guiada por ecografia ou TAC e laparoscopia/laparotomia cirúrgica. Não há diferenças significativas da sensibilidade diagnóstica destes métodos[22, 29, 30, 31, 32, 33]. No entanto, o sucesso diagnóstico conseguido através da técnica de biopsia aspirativa percutânea é menor que 50%. A aspiração por agulha fina por ecoendoscopia é uma excelente alternativa diagnóstica. Na realidade, a American Joint Comission on Cancer recomenda a aspiração guiada por ecoendoscopia como a modalidade preferida para estabelecimento do diagnóstico diferencial das massas pancreáticas[34]. Está descrito um caso de diagnóstico de tuberculose pancreático-biliar através de escovado biliar obtido por colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE)[35]. Apesar do descrito, a nossa experiência mostrou que a aspiração guiada por TAC foi uma excelente técnica para colheita de material, com a vantagem de permitir a drenagem da colecção líquida pancreática. A nossa experiência está de acordo com outros casos de diagnóstico de tuberculose pancreática realizado através de produto obtido por aspiração percutânea[15, 36, 37, 38].

A tuberculose pancreática pode mimetizar clínica e radiologicamente o carcinoma pancreático[10, 16, 17], cistadenomas[39] ou pseudoquistos[40]. Uma revisão de 58 doentes com tuberculose pancreática revelou que 35 doentes tiveram um diagnóstico inicial de neoplasia pancreática[8]. Na realidade, como referido anteriormente, na maior parte das vezes, a tuberculose pancreática não é suspeitada previamente à laparotomia realizada para exérese dum pressuposto carcinoma pancreático[18]. Neste caso clínico, a tuberculose pancreática mimetizou um pseudo-quisto. Enfatizamos assim, a importância da inclusão da TB nos diagnósticos diferenciais das massas pancreáticas, dado que a instituição da terapêutica médica duma forma precoce e assertiva possibilita a cura.

A maioria dos casos de tuberculose pancreática responde favoravelmente aos anti-bacilares com isoniazida/rifampicina/pirazinamida/etambutol ou estreptomicina durante 9 meses a 1 ano.[8, 13]. Não estão definidas as indicações para a terapêutica cirúrgica. Singh *et al.*, propuseram um algoritmo para o tratamento dos doentes com tuberculose pancreática. Num doente com diagnóstico confirmado de tuberculose pancreática, se não ocorrer regressão da massa após terapêutica anti-bacilar, deve ser submetido a cirurgia de exérese da massa (pancreaticoduodenectomia de Whipple)[11]. Numa revisão coreana de 11 casos de tuberculose pancreática, todos foram submetidos a terapêutica médica sem necessidade de abordagem cirúrgica[12]. Neste caso clínico, a ausência de resposta aos anti-bacilares obrigou a abordagem cirúrgica, No entanto, a constatação de tuberculose disseminada[41, 42] abdominal

QUADRO I – EVOLUÇÃO ANALÍTICA

	Início terapêutica	1.ª semana	2.ª semana	3.ª semana	4.ª semana
Hg (g/dL)	10,0	9,0	9,5	9,4	9,1
Lc / NT (%/uL)	17,270/81	8,360/79	6,280/67,1	4,270/67	19,170/90,7
Plaquetas (/uL)	492.000	450.000	463.000	399.000	255.000
TGO/TGP (U/L)	19/5	21/5	60/40	103/87	105/90
BT/ BD (mg/dL)	0,58/0,28	0,86/0,50	1,38/0,6	1,89/1,16	7,89/5,53
G-GT/FA (U/L)	106/249	166/335	500/761	1002/961	1062/972
U/C (mg/dL)	12/0,36	17/0,34	17/0,50	29/0,56	40/0,77
PCR (mg/dL)	5,96	5,00	5,69	7,32	9,67
Amilase (U/L)	23	35	54	97	200
Pro-trombina %	80	71	74	72	70

Hg–hemoglobina; Lc–leucócitos; NT–neutrófilos; TGO-transaminase glutâmico oxalacética; TGP-Transaminase glutâmico pirúvica; BT-bilirrubina total; BD-bilirrubina directa; G-GT-Gama-Glutamiltransferase; FA–fosfatase alcalina; U-ureia; C-creatinina; PCR–Proteína C Reactiva

impossibilitou a realização de pancreaticoduodenectomia de Whipple recomendada nos casos refractários à terapêutica médica.

O prognóstico da tuberculose pancreática é favorável com a instituição da terapêutica médica (anti-bacilares). Numa revisão de 58 casos, apenas foi registada 1 morte[8]. Em estudo de *follow-up* de 28 doentes com tuberculose pancreática ocorreu resolução do quadro após 3 a 12 meses de anti-bacilares em 24 dos doentes. Esta doente teve uma evolução atípica com agravamento progressivo e morte. Os factores que poderão ter contribuído para esta evolução desfavorável foram a coexistência de infecção pancreática por *Mycobacterium tuberculosis*, MRSA e *Klebsiella pneumoniae*, a demora de diagnóstico que culminou em evolução para pancreatite necrohemorrágica e disseminação abdominal da tuberculose e a intercorrência com hepatite medicamentosa.

/ Bibliografia

1. Antunes A, "Situação Epidemiológica da Tuberculose e Resultados em Dezembro de 2008 – Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose". Direcção Geral da Saúde – Ministério da Saúde. Março 2009.

2. Auerbach O. "Acute generalized miliary tuberculosis". *Am J Pathol* 1944; 20:121-36.

3. Bhansali SK. "Abdominal tuberculosis. Experiences with 300 cases". *Am J Gastroenterol* 1977; 67:324-37.

4. Franco-Paredes C, Leonard M, Jurado R, Blumberg HM, Smith RM. "Tuberculosis of the pâncreas: Reporto of two cases and review of literature". *Am J Med Sci* 2002; 323:54-8.

5. Porter A. "The bacteriolytic action of gland extracts on tubercle bacilli". *J Hygeine* 1917; 16: 55-6.

6. Day A, Gibbs W. "The action of pancreatic juice on bacteria". *J Infect Dis* 1930; 46:26-30.

7. De Backer AI, Mortelé KJ, Bomans P, De Keulenaer BL, Vanschoubroeck IJ, Kockx MM. "Tuberculosis of the pancreas: MRI features". *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184:50-4.

8. Xia F, Poon RT, Wang SG, Bie P, Huang XQ, Dong JH. "Tuberculosis of pancreas and peripancreatic lymph nodes in immunocompetent patients: experience from China". *World J Gastroenterol* 2003; 9:1361-4.

9. Nagar AM, Raut AA, Morani AC, Sanghvi DA, Desai CS, Thapar VB. "Pancreatic tuberculosis: a clinical and imaging review of 32 cases". *J Comput Assist Tomogr* 2009; 33:136-41.

10. Foo FJ, Verbeke CS, Guthrie JA, Ala A, Menon KV. "Pancreatic and peripancreatic tuberculosis mimicking malignancy". *JOP. J Pancreas* (Online) 2007; 8:201-5.

11. Singh DK, Haider A, Tatke M, Kumar P, Mishra K. "Primary Pancreatic Tuberculosis Masquerading as a pancreatic tumor leading to Whipple's pancreatico duodenectomy, a case report and a review of the literature". *JOP. J. Pancreas* 2009; 10 (4): 451-456.

12. Sung Bum Cho, MD. "Pancreatic tuberculosis presenting with Pancreatic Cystic Tumor: a case report and a review of the literature". *DOI* 2009: 535.

13. Shapiro RH, Maher MM, Misdraje J. "Case Records of the Massachusetts General Hospital. Case 3-2006. A 63 Year-old woman with jaundice and a pancreatic mass". *N. Engl J Med* 2006; 354: 398-406.

14. Saluja SS, Ray S, Pal S, Kukaraja M, Srivastava DN, Sahni P, Chattopadhyay TK. "Hepatobiliary and pancreatic tuberculosis: a two decade experience". *BMC Surg* 2007: 7-10.

15. Demir K, Kaymakoglu S, Besisik F, Durakoglu Z, Ozdil S, Kaplan Y, et al. "Solitary pancreatic tuberculosis in immunocompetent patients mimicking pancreatic carcinoma". *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1071-4.

16. Tan KK, Chen K, Liau KH, Ho CK. "Pancreatic tuberculosis mimicking pancreatic carcinoma: series of three cases". *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009 May 26.

17. Eyal AS, Karusseit VO. "Tuberculosis of the pancreas mimicking carcinoma". *Int J Infect Dis.* 2008 Jan; 12(1):108-10.

18. Felekouras E, Karavokyros IG, Griniatsos J, Kouraklis G, Diamantis T, Bastounis E. "Pancreatic tuberculosis: a medical disease posing surgical dilemmas". *Int Surg.* 2006 May; 91 (3): 168-73.

19. Dang S, Atig M, Saccente M, Olden K, Aduli F. "Isolated tuberculosis of the pancreas: a case report". *JOP J Pancreas.* 2009: 10(1): 64-66.

20. Warshaw AL. "Current Concepts in pancreatic abscesses". *N. Engl J Med* 1972; 287:1234-1236.

21. Lal R, Mishra B, Dogra V, Mandal A. "Tubercular pancreatic abscess: A case report". *Indian J Med Microbiol* 2003; 21:61-2.

22. Stambler JB, Klibaner MI, Bliss CM, LaMont JT. "Tuberculous abscess of the pancreas". *Gastroenterology* 1982;82:922-5.

23. Ladas SD, Vaidakis E, Lariou C, Anastasiou K, Chalevelakis G, Kintzonidis D, e tal. "Pancreatic tuberculosis in non-immunocompromised patients: a report of two cases and a literature review". *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1998; 10: 973-6.

24. Brugge Wr, Mueller PR, Misdraji J. "Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 8-2004. A 28-year-old man with abdominal pain, fever and a mass in the region of the pancreas". *N Engl J Med* 2004 Mar 11; 350 (11): 1131-8.

25. Pombo F, Diaz Candamio MJ, Rodriguez E, Pombo S. "Pancreatic tuberculosis: CT findings". *Abdom Imaging* 1998; 23: 394-7.

26. Farhat LC, Jaacoub IB, Hamzaoui S, Garbi L, Dali L, et al. "Aspects radiocliniques trompeurs de la tuberculose abdominal". *J Radiol* 2007; 88: 1729-31.

27. Takhtani D, Gupta S, Suman K, Kakkar N, Challa S, Wig JD, Suri S. "Radiology of pancreatic tuberculosis: a report of three cases". *Am Gastroenterol* 1996; 91:1832-4.

28. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, e tal. "Sensitivity and specifity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories". *J. Clin Microbiol* 1994; 32: 277-84.

29. Mallery JS, Centeno BA, Hahn PF, Chang Y, Washaw AL, Brugge WR. "Pancreatic tissue sampling guide by EUS, CT/US and surgery: a comparison of sensitivity and specifity". *Gastrointest Endosc* 2002; 56:218-24.

30. Stock KP, Riemann JF, Stadler W, Rosch W. "Tuberculosis of the pancreas". *Endoscopy* 1981;13:178-80.

31. Addison NV. "Abdominal tuberculosis: A disease revived". *Ann R Coll Surg Engl* 1983;65:105-11.

32. Khoury GA, Payne CR, Harvey DR. "Tuberculosis of the peritoneal cavity". *Br J Surg* 1978;65:808-11.

33. Pandita KK, Sarla, Dogra S. "Isolated pancreatic tuberculosis". *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2009. 27, 3, 259-260.

34. "Exocrine pancreas". In: Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, eds. *AJCC Cancer Staging Handbook.* 6th ed. New York: Springer- Verlag, 2002:182.

35. Sachdev A, D'Cruz S, Chauhan S, Thakur R, Kapoor V, Handa U. "Pancreaticobiliary tuberculosis diagnosed by endoscopic brushings". *JOP. J Pancreas* 2006; 7:665-9.

36. Schneider A, von Birgelen C, Duhrsen U, Gerken G, Runzi M. "Two cases of pancreatic tuberculosis in nonimmunocompromised patients. A diagnostic challenge and a rare cause of portal hypertension". *Pancreatology* 2002; 2:69-73.

37. D´CruzS, Sachdev A, Kaur L, Handa U, Bhalla A, Lehl SS. "Fine needle aspiration diagnosis of isolated pancreatic tuberculosis. A case report and a review of the literature". *JOP. J. Pancreas* 2003; 4: 158-62.

38. Ahlawat S, Pishvaian A, Lewis J, Haddad n. "Pancreatic tuberculosis diagnosed with endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration". *JOP. J. Pancreas.* 2005. 6(6): 598-602.

39. Hong SG, Kim JS, Joo MK, Lee KY, Kim KH, Oh CR, Park JJ. "Pancreatic tuberculosis masquerading as pancreatic serous cystadenoma". *World J Gastroenterology* 2009 February 28; 15 (8): 1010-1013.

40. Karia K, Mathuer SK. "Tuberculous cold abscess simulating pancreatic pseudocyst". *J. PostGrad Med* 2000; 46: 33-34.

41. Haddad FS, Ghossain A, Sawaya E, Nelson AR. "Abdominal tuberculosis". *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 724-735.

42. Alvarez S, McCabe WR. "Extrapulmonary tuberculosis revisited: a review of experience at Boston City and other hospitals". *Medicine* (Baltimore) 1984; 63:25-55.

CASO CLÍNICO / *CLINICAL CASE*

Hepatite colestática por infecção a Epstein-Barr tratada por Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS)

Acute cholestatic liver failure due to Epstein-Barr infection treated with Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS)

/ S. Lourenço[1] / F. Caeiro[2] / M. H. Pacheco[3] / G. Martins[3] / R. Perdigoto[4] / J. A. Malhado[5]

[1] Interna do Internato Complementar de Medicina Interna
[2] Interno do Internato Complementar de Nefrologia
[3] Assistente Hospitalar Graduada de Medicina Interna
[4] Assistente Hospitalar Graduado de Medicina Interna, Unidade de Transplante
[5] Chefe de Serviço de Medicina Interna, Director de Serviço de Medicina 1

Serviço de Medicina Interna 1 (Dir. Dr. J. A. Malhado)
Hospital Curry Cabral, Lisboa

Correspondência:

Dra. Sofia Lourenço
Serviço de Medicina 1
Hospital de Curry Cabral
Rua da Beneficiência nº8
1600 Lisboa

Telefone: +351 21 7924200
e-mail: sofilourenco@iol.pt

/ Resumo

A infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) é altamente prevalente, ainda que frequentemente assintomática. Durante a fase aguda da infecção é comum a ocorrência de uma elevação ligeira e transitória das transaminases, mas em 5% dos casos estabelece-se um padrão colestático. Os autores apresentam o caso de um homem de 35 anos que desenvolveu hepatite colestática aguda durante infecção pelo EBV. Após falência do tratamento com corticóides, foi sujeito a três sessões de MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System), com recuperação completa.

Palavras-chave: hepatite aguda, vírus Epstein-Barr, MARS.

/ Abstract

Infection by Epstein-Barr is highly prevalent, although frequently asymptomatic. Mild and transient elevation of liver aminotransferase is common during the acute phase of the infection, but about 5% of patients develop a cholestatic pattern of liver disease. We present a case of a 35 year old male who developed an acute cholestatic liver failure during infection by Epstein-Barr virus. After unsuccessful treatment with corticosteroids, he was treated with MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System), leading to complete recovery.

Key-words: *Acute hepatitis; Epstein-Barr virus; MARS.*

/ Introdução

O vírus Epstein Barr (EBV) é um membro da família de vírus Herpes que tem o homem como hospedeiro. A infecção por este vírus é altamente prevalente, pelo que 90% dos indivíduos saudáveis apresentam serologia a documentar exposição prévia. A transmissão é feita por via oral e, após infecção, o vírus atinge o sistema reticuloendotelial, estimulando a imunidade celular e humoral[1]. Embora na maior parte dos casos assintomática, a infecção pode manifestar-se na forma de mononucleose infecciosa, um síndrome caracterizado por febre, faringite, adenopatias, esplenomegália e linfomonocitose. As elevações ligeiras e transitórias das transaminases são comuns mas só raramente se estabelece doença hepática grave[2].

/ Caso clínico

Um homem de 35 anos, leucodérmico, foi internado no nosso serviço de Medicina Interna por falência hepática aguda. O doente referia o início dos sintomas dois meses antes, altura em que iniciou febre, astenia e odinofagia, tendo sido medicado com eritromicina. Ao 5.º dia de sintomas (3.º após início da antibioterapia) inicia colúria e icterícia, pelo que recorreu ao serviço de urgência. Analiticamente apresentava leucócitos 10.790 (N: 5.000-10.000) com 73% de linfócitos, bilirrubina total (Bt) 5,9mg/dL (N:0,1-1,2) e conjugada (Bc) 4,3mg/dL (N:0,1-0,4), fosfatase alcalina (FA) 278U/L (N:20-140), aspartato aminotransferase (AST) 215U/L (N:17-59), alanina aminotransferase (ALT) 414U/L (N:21-72) e monoteste positivo. Teve alta do serviço de urgência com o diagnóstico de mononucleose infecciosa, tendo-lhe sido prescrito silimarina. Um mês depois mantinha astenia intensa e aumento da icterícia, à qual se associou prurido generalizado, pelo que regressou ao SU, tendo sido internado.

À entrada apresentava Bt 45,2mg/dL, Bc 42,4mg/dL, FA 427U/L, AST 55U/L ALT 76U/L. As serologias para infecção pelo vírus da hepatite A, B, C, citomegalovírus, vírus da imunodeficiência adquirida e para toxoplasmose foram negativas, tal como pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA), anti-mitocondriais (AMA), anti-músculo liso (AML), anti--microssomas de fígado e rim (LKM), alfa1 antripsina, ceruloplasmina e alfa-fetoproteína. A IgM EBV-VCA foi positiva, estabelecendo o diagnóstico.

A ecografia abdominal mostrava hepatomegália sem dilatação das vias biliares e esplenomegália. Realizou biopsia hepática que foi compatível com padrão de colestase com arquitectura lobular preservada e ausência de necrose hepatocelular (Fig. 1 e 2).

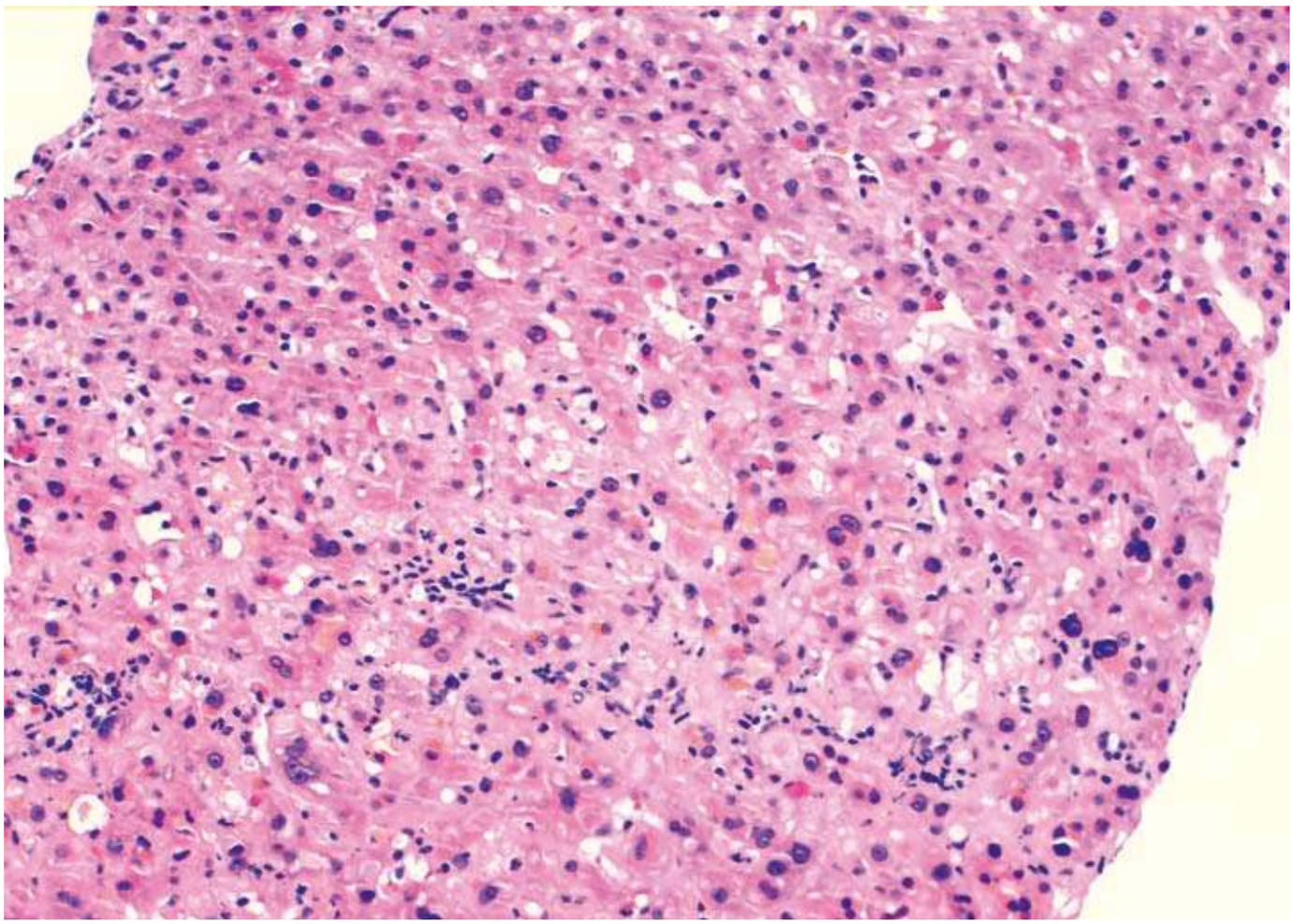
Iniciou tratamento com corticóides e ácido ursodesoxicólico. À terceira semana após a admissão, cerca de dois meses após o início dos sintomas, mantinha icterícia grave, com níveis de bilirrubina total persistentemente acima dos 20mg/dL.

Realizou 3 sessões de terapêutica com MARS, com 600cc de albumina a 20% e duração de 6 horas. No final da última sessão a bilirrubina total baixou de 20,5 para 11mg/dL, tendo tido alta. Durante o *follow-up* verificou-se uma melhoria progressiva, com normalização de todos os parâmetros laboratoriais ao 4.º mês.

/ Discussão

Durante a fase aguda da infecção por EBV a maioria dos doentes apresenta uma elevação moderada das transaminases, com 90% a apresentarem valores compatíveis com hepatite ligeira à 2.ª e 3.ª semanas de sintomas. Estas alterações são habitualmente auto-limitadas e benignas, constatando-se recuperação completa às 2 a 6 semanas[3].

A ocorrência de icterícia neste contexto é rara e pode reflectir uma hepatite mais grave ou a existência de anemia hemolítica associada. No entanto, em 5% dos doentes, estabelece--se um padrão colestático com importante elevação da bilirrubina, fosfatase alcalina



Figuras 1A – Aspecto microscópico da biopsia hepática mostrando arquitectura lobular globalmente conservada, sem evidência de necrose e padrão colestático.

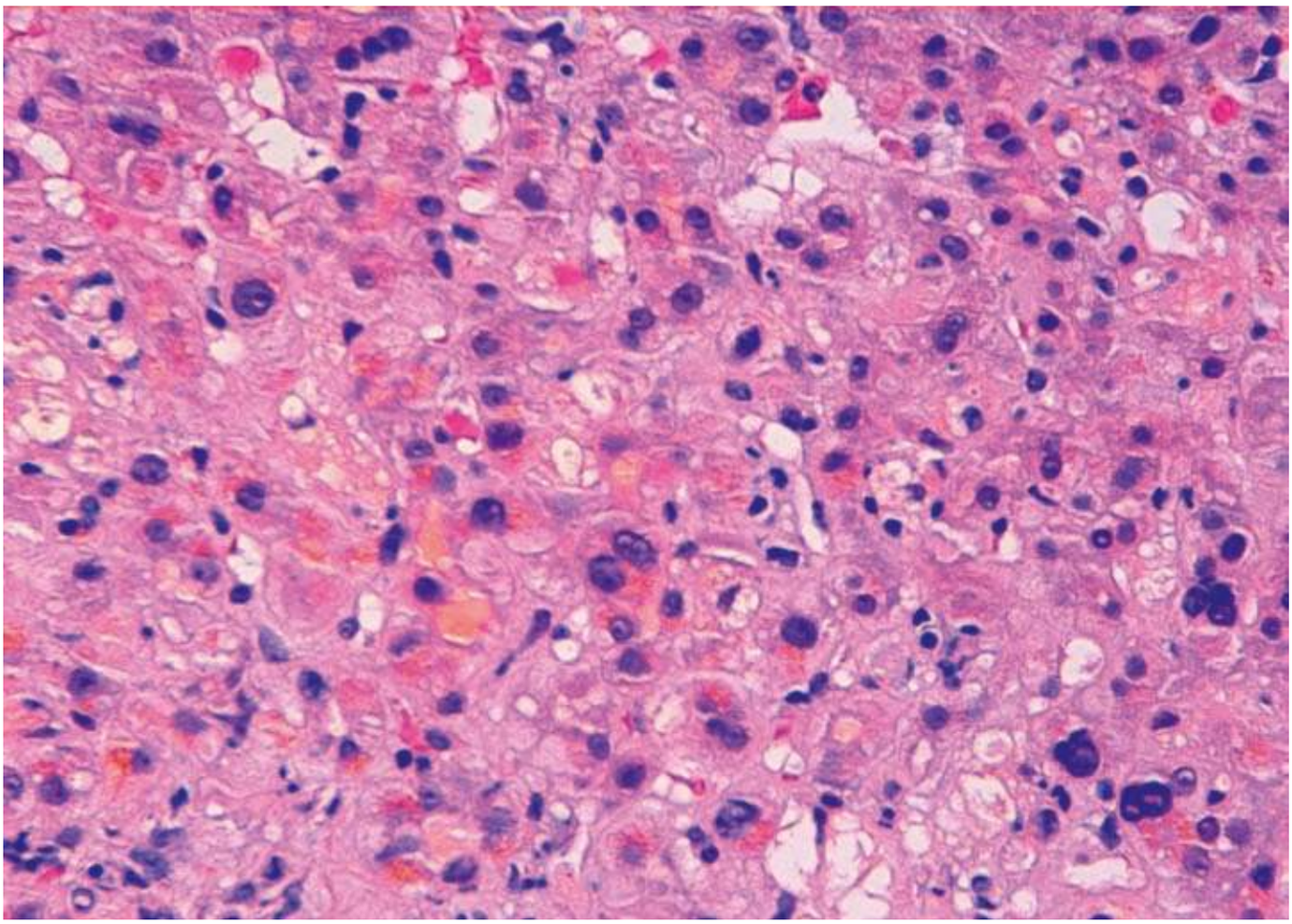
e desidrogenase láctica [4]. O mecanismo pelo qual se estabelece a colestase está mal compreendido, especulando-se sobre uma inibição directa pelo vírus da enzima superóxido dismutase ou sobre a infecção directa do epitélio das vias biliares[5, 6].

As drogas são responsáveis por 10% das hepatites agudas. Vários compostos têm demonstrado toxicidade hepática. Os macrólidos, incluindo a eritromicina que foi consumida pelo nosso doente, têm sido associados a doença colestática. A incidência desta toxicidade é baixa, calculando-se em 3,6 casos por cada 100.000 doentes tratados[7]. Inicia-se em regra 10 a 20 dias após a primeira administração, sendo frequentemente acompanhada de eosinofilia e exantema[8]. O prognóstico é habitualmente benigno e num estudo recente não se demonstraram casos fatais associados à lesão hepática por eritromicina[9].

Neste caso verificaram-se dois mecanismos possíveis para a colestase, o vírus e a eritromicina, tendo a biopsia confirmado o padrão colestático, que é possível em ambas as causas. Embora a etiologia tóxica não possa ser formalmente excluída como causa desta hepatite, a relação temporal entre a exposição e os sintomas favorece a etiologia viral. Também é admissível que antibiótico e vírus tenham tido efeito sinérgico, explicando o carácter persistente das alterações, mas esta teoria não pode ser comprovada.

Embora a evolução benigna seja a regra nas infecções por EBV, até 1998 foram descritos em todo o mundo pelo menos 17 casos de falência hepática fulminante[10]. Desde então têm sido descritos alguns casos esporádicos, alguns dos quais necessitaram transplante[11]. Na impossibilidade de transplante a mortalidade associada à falência hepática aguda atinge os 80%.

O Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) é uma técnica descrita pela primeira vez em 1993. Desde então tem sido usado de forma crescente na insuficiência hepática, habitualmente como ponte para o transplante ou como terapêutica de suporte para permitir ao fígado tempo para a sua regeneração espontânea. Vários estudos não controlados demonstraram o benefício desta técnica na falência hepática aguda, com melhoria da encefalopatia, diminuição na pressão intracraniana e aumento da pressão de perfusão cerebral,



Figuras 1B — Aspecto microscópico da biopsia hepática mostrando arquitectura lobular globalmente conservada, sem evidência de necrose e padrão colestático.

pressão arterial média, resistências vasculares sistémicas e índice cardíaco[12, 13]. Num estudo recente envolvendo 22 doentes com insuficiência hepática aguda com critérios para transplante verificaram-se 32% de recuperações após aplicação do MARS, obviando a necessidade de transplante[14].

Os doentes envolvidos neste e noutros estudos apresentavam falência hepática por variadas razões, na maior parte das vezes secundária a hepatite aguda alcoólica ou viral por infecção a VHB, bem como por exposição a tóxicos.

Após três sessões de terapia com MARS o nosso doente apresentou uma marcada diminuição no nível de bilirrubina, o que permitiu a alta sob vigilância.

Provavelmente pelo facto de o EBV raramente causar doença hepática grave na revisão bibliográfica efectuada só identificamos um caso prévio de tratamento por MARS neste contexto[2]. Tal como no nosso doente verificou-se uma importante redução nos valores de bilirrubina e o doente apresentou uma recuperação completa após 3 sessões de MARS.

/ Conclusão

A infecção por EBV associa-se geralmente a uma hepatite ligeira mas, em casos raros, pode ser causa de falência hepática aguda com padrão colestático. É possível que a história da infecção seja influenciada negativamente por factores externos como a medicação. O tratamento com MARS pode ser uma alternativa terapêutica nestes doentes, garantindo o suporte da função hepática até que a função do órgão se restabeleça por completo. Sem esta opção, o transplante hepático apresenta-se como a única solução.

/ Bibliografia

1. Cohen JI. "Epstein-Barr virus infection". *N Engl J Med* 2000; 343(7):481-92.
2. Méndez-Sanchez N, Aguilar-Dominguez C, Chavez-Tapia N, Uribe M. "Hepatic manifestations of Epstein-Barr viral infection". *Ann Hepatol* 2005; 4(3): 205-9.
3. Crum N. "Epstein-Barr virus hepatitis: case series and review". *South Med J* 2006; 99:544-7.
4. Edoute Y, Baruch Y, Lachter J, Furman E, Bassan L, Assy N. "Severe cholestatic jaundice induced by Epstein-Barr virus infection in the elderly". J *Gastroenterol Hepatol* 1998 ;13(8):821-4.
5. Hinedi TB, Koff RS. "Cholestatic hepatitis induced by Epstein-Barr infection in an adult". *Dig Dis Sci* 2003; 48: 539-41.
6. Bernstein CN, Minuk GY. "Infectious mononucleosis presenting with cholestatic liver disease". *Ann Inter Med* 1998: 128: 509.
7. Derby LE, Jick H, Henry DA, Dean AD. "Erythromycin-associated cholestatic hepatitis". *Med J Aust* 1993; 158(9): 600-602.
8. Robles M, Andrade RJ. "Hepatotoxicity by antibiotics: update in 2008". *Rev Esp Quimioter* 2008: 21(4): 224-33.
9. Bjornsson E, Olsson R. "Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease". *Hepatology* 2005: 42(2): 481-9.
10. Feranchak AP, Tyson RW, Narkewicz MR, Karrer FM, Sokol RJ. "Fulminant Epstein-Barr viral hepatitis: orthotopic liver transplantation and review of the literature". *Liver Transpl Sur* 1998; 4(6): 469-76.
11. Dumortier J, Mekki Y, Rimmelé T, Ber C, Maillard E, Fafi-Kremer S, et al. "EBV-induced fulminant hepatic failure: favorable outcome after liver transplantation". *Gastroenterol Clin Biol* 2007 ;31(8-9 Pt 1):725-8.
12. Ben Abraham R, Szold O, Merhav H, Biderman P, Kidron A, Nakache R et al. "Rapid resolution of brain oedema and improved cerebral perfusion pressure following the molecular adsorbent recycling system in acute liver failure patients". *Transplant Proc* 2001, 33:2897-2899.
13. Schmidt LE, Wang LP, Hansen BAH, Larsen FS: "Systemic hemodynamic effects of treatment with the molecular adsorbents recirculating system in patients with hyperacute liver failure: a prospective controlled trial". *Liver Transplant* 2003; 9: 290-297.
14. Camus C, Lavoué S, Gacouin A, Le Tulzo Y, Lorho R, Boudjéma K et al. "Molecular adsorbent recirculating system dialysis in patients with acute liver failure who are assessed for liver transplantation". *Intensive Care Med* 2006; 32(11): 1817-25.

EVENTOS NACIONAIS DA ESPECIALIDADE >>

/ X Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica VIII Congresso Nacional sobre SIDA
6 a 9 de Outubro de 2010
Hotel Vila Galé, Coimbra
Organização conjunta da SPDIMC e da APECS
Contactos da comissão organizadora:
Serviço de Doenças Infecciosas
Hospitais da Universidade de Coimbra
3000-075 Coimbra, Portugal
E-mail: joliveira@huc.min-saude.pt
Secretariado: Agência Abreu
www.congdinfecciosasesida2010.com

/ I Jornadas do Serviço de Medicina Interna III Jornadas de Infecciologia do Hospital Central do Funchal
26 a 30 de Outubro de 2010
Hotel CS Madeira, Funchal
Secretariado Científico:
Secretária da Direcção do Serviço de Medicina Interna do CHF
E-mail: medicina@srs.pt
Secretariado Técnico: Merck Sharp & Dohme

EVENTOS INTERNACIONAIS DA ESPECIALIDADE >>

/ 48th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America
Date: October 21, 2010 - October 24, 2010
City: Vancouver, Canada
Contact: IDSA, 1300 Wilson Blvd, Suite 300, Arlington, VA 22209
Phone: 703-299-0200
Fax: 703-299-0204
E-Mail: info@idsociety.org

/ American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 59th Annual Meeting 2010
Date: November 03, 2010 - November 07, 2010
City: Atlanta, United States
American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 111 Deer Lake Road, Suite 100
Deerfield, Illinois 60015 USA
Phone: 1-847-480-9592
Fax: 1-847-480-9282

/ XV Congreso Panamericano de Infectología III Congresso da SIAI
7 a 11 de Abril de 2011
Punta del Este, Uruguay
Info@apiuruguay.com
www.apiuruguay.com

21st Annual Meeting of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
Date: May 07, 2011 - May 10, 2011
City: Milan, Italy
Contact: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
Phone: 41-616-867-799
Fax: 41-616-867-798
E-Mail: info@escmid.org

/ 12th Conference of the International Society of Travel Medicine
May 8 – 12, 2011
Boston, USA
www.istm.org

/ 6th International AIDS Society (IAS) Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (IAS 2011)
Date: July 17, 2011 - July 20, 2011
City: Rome
Contact: Conference Secretariat: International AIDS Society
Phone: 41-0-22-7-100-800
Fax: 41-0-22-7-100-899
E-Mail: info@iasociety.org

/ American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 60th Annual Meeting 2011
Date: December 04, 2011 - December 08, 2011
City: Philadelphia, United States
American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 111 Deer Lake Road, Suite 100
Deerfield, Illinois 60015 USA
Phone: 1-847-480-9592
Fax: 1-847-480-9282

A sua opinião é importante... ... participe!

Envie-nos as suas opiniões, questões, artigos e/ou sugestões para:
Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas – Fórum
Largo Fernandes Costa, 5 Cave Dta.
1700-187 Lisboa
Telefone/Fax: 217950462
E-mail: spdimc@gmail.com

A **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas** concebeu este espaço para si. À semelhança de qualquer fórum, debateremos, responderemos e elucidaremos questões.
Acreditamos que este vai ser um espaço de interesse e debate para todo o tipo de leitores. Sob o arbítrio do Conselho Redactorial da **RPDI**, publicaremos as respostas às questões que nos forem apresentadas pelos nossos leitores, independentemente de serem ou não assinantes da Revista.

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

A **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas (RPDI)** aceita para publicação Artigos Originais, Artigos de Revisão, Casos Clínicos, Normas de Actuação Clínica e Cartas ao Director, que se relacionem com o vasto campo da patologia infecciosa, dentro dos seus múltiplos aspectos epidemiológicos, etiológicos, fisiopatológicos, clínicos, laboratoriais, terapêuticos, profilácticos e de saúde pública, e abrangendo os domínios da bacteriologia, virologia, micologia, parasitologia, imunopatologia, farmacologia, etc.
Os artigos submetidos para publicação deverão ser preparados de acordo com os Requisitos Uniformes para Apresentação de Manuscritos a Revistas Biomédicas elaborados pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (N Engl J Med 1997; 336: 309-316), que se resume mais adiante.
Os artigos aceites para publicação passarão a ser propriedade da **Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica (SPDIMC)**, não podendo ser reproduzidos, no todo ou em parte, sem autorização por escrito desta Sociedade.
Os artigos, escritos em português ou em inglês, devem ser dirigidos ao Editor e enviados, obrigatoriamente, em suporte informático, para o endereço de correio electrónico da RPDI (spdimc@gmail.com), sempre acompanhados da checklist (ver página seguinte) devidamente preenchida e dos documentos anexos ali exigidos que, depois de assinados, podem ser enviados por correio ou Fax.
O ficheiro deverá ser escrito em Microsoft Word, sem tabulações nem indentações. No caso de o conteúdo conter imagens, deverá o autor proceder à sua digitalização em resolução suficiente para permitir a publicação.

Modificações e Revisões

No caso do artigo ser aceite após modificações, estas devem ser realizadas pelos autores no prazo de trinta dias.
As provas tipográficas serão enviadas ao autor responsável pelo envio da correspondência, contendo a indicação do prazo de revisão, em função das necessidades de publicação da Revista. No entanto, a Direcção da Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas solicita aos autores que o prazo para a correcção das provas tipográficas não ultrapasse os cinco dias úteis.
O não respeito pelo prazo desobriga da aceitação da revisão dos autores, sendo a mesma efectuada exclusivamente pelos serviços da Revista.

Artigos Originais

Os Artigos Originais devem ser preparados, segundo a seguinte ordem, iniciando-se cada item numa página separada: 1. Página do título; 2. Resumo; 3. Introdução; 4. Material e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Bibliografia; 8. Legendas; 9. Figuras; 10. Quadros. Todas as páginas devem ser numeradas no canto superior direito. A numeração das referências, figuras, tabelas e quadros deve ser feita pela ordem de aparecimento no texto.

1. Página do Título

1. Título – Deve ser conciso, não conter abreviaturas e não ultrapassar os 120 caracteres. Poderá englobar um subtítulo com um máximo de 45 caracteres. Deve ser escrito em português e inglês.
2. Autores – A identificação dos autores deve ser feita com a(s) inicial(is) do(s) primeiro(s) nome(s) e com o apelido. Deverá ser feita a identificação completa do serviço, departamento ou instituição onde o trabalho foi realizado. Apenas devem figurar como autores todos aqueles que tiveram um envolvimento directo na preparação e execução do trabalho.
3. Patrocínios – Deverão ser referidas todas as entidades que patrocinaram o trabalho.
4. Correspondência – Referir o nome, endereço, telefone, fax e e-mail do autor a quem deve ser enviada a correspondência.

2. Resumo

Os resumos são redigidos em português e inglês, não devendo ultrapassar as 200 palavras.
Devem ser organizados segundo os seguintes itens: Introdução, Objectivos, Métodos, Resultados e Conclusões. Não devem conter abreviaturas, referências ou notas de rodapé. O resumo deve ser completado com a enumeração de três palavra-chave que serão utilizadas para a indexação do artigo.

3. Texto

Não deve ultrapassar as 12 páginas. Deve incluir referência à aprovação da Comissão de Ética da Instituição e aos métodos estatísticos utilizados. Todos os fármacos devem ser referidos pelo seu nome genérico, sendo eventuais referências a nomes comerciais acompanhadas do nome e cidade do fabricante, feitas em rodapé. As abreviaturas, que são desaconselhadas, devem ser especificadas na sua primeira utilização. Os parâmetros utilizados devem ser expressos em Unidades Internacionais, com indicação dos valores normais. A identificação das figuras deverá ser feita em numeração árabe, e a dos quadros em numeração romana.

4. Bibliografia

Deve ser referenciada em numeração árabe, por ordem de aparecimento no texto. As referências devem seguir as recomendações da Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (N Engl J Med 1997; 336: 309-316) também disponíveis no seguinte endereço electrónico: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

5. Legendas

Devem ser escritas a dois espaços e numeradas em sequência.
As legendas devem ser numeradas em algarismos árabes pela sequência da citação no texto, e fornecerem a informação suficiente para permitir a interpretação da figura sem necessidade de consulta do texto.

6. Figuras e Fotografias

As figuras devem ser numeradas sequencialmente, com numeração árabe correspondente à da respectiva legenda, por ordem de introdução no texto. Todas as fotografias deverão ser digitalizadas em alta resolução e numeradas como as figuras.

7. Quadros e Gráficos

Devem ser escritos a dois espaços em folhas separadas e numerados com numeração romana segundo a sequência da citação no texto. O título surge na parte superior e na parte inferior serão colocadas todas as notas informativas (abreviaturas, significado estatístico, etc.).

RPDI Revista Portuguesa
de Doenças Infecciosas

Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa
de Doenças Infecciosas
e Microbiologia Clínica

Checklist destinada aos Autores

Título do manuscrito:

Nome do primeiro Autor:

- ☐ O manuscrito não foi, nem vai ser, enviado para publicação em qualquer outra revista médica.
- ☐ O Autor que consta no endereço postal será o responsável pela realização das eventuais correcções que venham a ser propostas pelos revisores do artigo e aceites pelos Autores e, também, pela revisão das provas, que deve estar concluída até 5 dias úteis após a notificação.
- ☐ O suporte financeiro, assim como as organizações envolvidas, foram declarados no manuscrito.
- ☐ Os Autores declararam, em documento anexo a esta *checklist*, todos os conflitos de interesses que possam envolver este manuscrito.
- ☐ Sempre que esteja em causa um projecto de investigação, a aprovação da comissão de ética foi referida no texto do manuscrito.
- ☐ Autorização por escrito, assinada por todos os Autores, cedendo à *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* a propriedade dos artigos (enviar como documento anexo a esta *checklist*).
- ☐ As referências bibliográficas seguem a norma internacional e foi confirmada a sua correcção — informações no site http://www.icmje.org/index.html.

Nota: para informações complementares sobre as normas de publicação, consulte a página correspondente que figura em cada número da *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* ou o site da SPDIMC- http://www.spdi.org/webspdi/.

Confirmo que todos os pontos desta checklist *foram por mim devidamente confirmados e aceito a responsabilidade pela correcção de todas as informações prestadas.*

(Assinatura do Primeiro Autor)

Data: ☐☐☐☐ / ☐☐ / ☐☐

(Este documento pode ser fotocopiado)