

Infecção do trato urinário

Como a tecnologia inovadora leva a um diagnóstico mais rápido e um tratamento mais direcionado da ITU

Introdução

Globalmente, as infecções do trato urinário (ITU) pertencem às infecções bacterianas mais frequentes, afetando cerca de 150 milhões de pessoas a cada ano [1]. Isso resulta não apenas em milhões de consultas médicas em ambientes de internação e ambulatoriais, mas também em altos gastos com saúde e custos sociais [2].

A via patogênica pode ser extraluminal por contaminação microbiana da zona periuretral e subsequente colonização em direção à bexiga ou intraluminal por colonização do trato urinário por meio de cateteres urinários. As infecções do trato urinário são, portanto, uma das principais infecções nosocomiais [2].

Clinicamente, as infecções do trato urinário são categorizadas como não complicadas ou complicadas, dependendo da ausência ou presença de anormalidades estruturais ou funcionais subjacentes do trato urinário, respectivamente [3]. Além disso, as infecções do trato urinário são diferenciadas em ITU inferior (cistite, uretrite) ou ITU superior (pielonefrite) [4].

Além do sexo feminino, uma infecção recente do trato urinário, atividade sexual, diabetes, obesidade e certa suscetibilidade genética são fatores de risco comuns associados a infecções do trato urinário inferior. As infecções complicadas do trato urinário estão relacionadas a doenças renais (por exemplo, doença renal crônica, insuficiência renal, transplante renal), obstruções do

trato urinário, retenção urinária, cálculos urinários, gravidez e imunossupressão [2].

Como as infecções do trato urinário podem seguir diferentes cursos sintomáticos ou até ser assintomáticos, o diagnóstico adequado da ITU combina a história do paciente, os sintomas urinários e o diagnóstico laboratorial. A ITU inferior manifesta-se com algúria, micção frequente, disúria, dor suprapúbica ou abdominal aguda, sensação geral de mal estar e, ocasionalmente, hematúria, urina turva ou com mau cheiro. A ITU superior mostra uma apresentação mais grave e sistêmica e, além dos sintomas da ITU inferior, incluem sensibilidade no ângulo costovertebral, febre e calafrios. Além disso, sintomas inespecíficos como cansaço, fadiga, dor de cabeça crônica, perda persistente de apetite, náusea, vômito, aumento intermitente da temperatura e alteração do estado mental podem indicar uma infecção do trato urinário [2]. Um diagnóstico baseado apenas no histórico do paciente e nos sintomas presentes ainda é comum em muitos países, mas geralmente impreciso [5].

Embora *Escherichia coli* uropatogênica seja o patógeno mais comum associado a infecções do trato urinário complicadas e não complicadas, vários microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e várias espécies de fungos, podem causar infecções do trato urinário (Fig. 1; [3]).

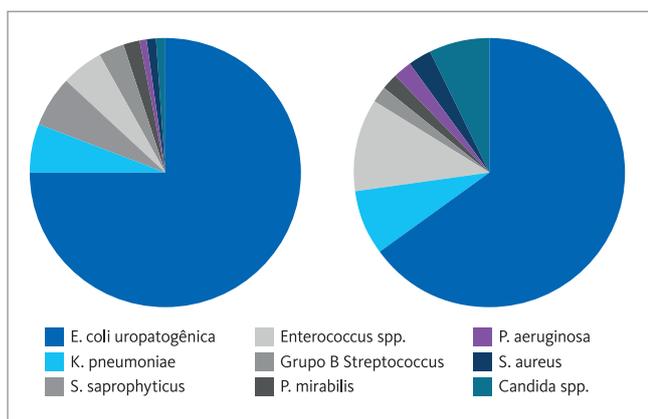


Fig. 1 - Epidemiologia de infecções do trato urinário complicadas (diagrama à esquerda) e não complicadas (diagrama à direita). Adaptado de [3].

Suspeita de infecções do trato urinário contribuem para altas cargas de trabalho em laboratório, embora, no final, até 80% das amostras sejam descartadas [6]. Isso causa tratamento desnecessário e empírico de pacientes com antibióticos de amplo espectro, promovendo o aumento da resistência antimicrobiana. Como apenas 17% de todos os pacientes em potencial de ITU que são tratados com antibióticos foram testados anteriormente por exame de urina adequado, a uma nova prescrição de antibióticos é frequentemente necessária [7].

O diagnóstico clássico de ITU

O exame macroscópico de uma amostra de urina é frequentemente o primeiro indicador de uma suspeita de infecção do trato urinário, uma vez que a coloração anormal por macro hematuria ou ITU por Pseudomonas e urina com mau cheiro ou turbidez devido à piúria são manifestações urinárias conhecidas.

A tira de teste é o exame de triagem mais utilizado para a presença de infecções do trato urinário. A presença de nitrito como produto metabólico derivado da redução de nitrato urinário por certas espécies nitrogenadas (por exemplo, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*) é um indicador de bacteriúria. No entanto, muitos patógenos do trato urinário não geram nitrito (por exemplo, *Enterococcus*, *Gonococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*), o que significa que o nitrito nesse contexto não é um parâmetro confiável. A esterase de leucócitos, a proteína e o sangue são parâmetros comuns que indicam condições inflamatórias. No entanto, a sensibilidade e a especificidade geralmente são relativamente baixas e um resultado negativo da tira de teste é insuficiente para descartar infecções do trato urinário na presença de sintomas clássicos [5].

A microscopia de amostras de urina corada pelo Gram é um padrão comum, isto é, a investigação microscópica de sedimentos de urina que foram secos ao ar em uma lâmina microscópica e corados com coloração Gram. A principal vantagem da microscopia de urina é a informação fornecida sobre o agente infeccioso para iniciar a terapia antimicrobiana. Embora a sensibilidade da microscopia de urina seja altamente confiável para amostras com $\geq 10^5$ CFU/

mL, a baixa sensibilidade relatada para concentrações bacterianas menores limitam sua utilidade clínica, especialmente para ITU não complicada em ambiente ambulatorial [8].

A cultura de urina continua sendo um teste importante no contexto do diagnóstico de ITU, principalmente para identificar o microrganismo infeccioso. A definição comum de padrão-ouro da bacteriúria é a presença de $\geq 10^5$ CFU/mL, que foi estabelecida para mulheres com pielonefrite aguda ou ITU assintomática, mas foi adaptada para outros grupos de pacientes [8]. Como muitos pacientes com ITU apresentam bacteriúria com $\leq 10^5$ CFU/mL, muitos laboratórios já aplicam contagens de colônias mais baixas como valores de corte para aumentar a sensibilidade da cultura de urina.

As culturas de urina positivas finalmente resultam em testes de suscetibilidade a antibióticos (antibiograma) para identificar um antibiótico adequado e específico para o tratamento direcionado de uma infecção microbiana presente. O teste de suscetibilidade por difusão em ágar [9] ainda é o padrão-ouro confiável, mas abordagens indiretas, incluindo tecnologias emergentes, como espectrometria de massa MALDI-TOF e medição de metabólitos bacterianos na presença de antibióticos, estão sendo avaliadas [10].

Detecção de partículas urinárias por citometria de fluxo fluorescente

O Sysmex Série-UF usa citometria de fluxo fluorescente para detectar partículas celulares e acelulares, incluindo bactérias, células semelhantes a leveduras, glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e outros parâmetros em amostras de urina e de fluido corporal (Fig. 2).

Parâmetros diagnóstico	Parâmetros de pesquisa
Eritrócitos	Eritrócitos lisados
Eritrócitos não lisados	Células redondas pequenas
Leucócitos	Restos celulares
Células epiteliais (C.E.)	Condutividade
C.E. escamosas	Osmolalidade
C.E. não escamosas	
C.E. de transição	
C.E. tubulares renais	
Cilindros	Parâmetros de líquidos corporais
Cilindros hialinos	Eritrócitos
Cilindros patológicos	Leucócitos
BACTÉRIAS	Mononucleares #/%
Cristais	Polimorfonucleares #/%
Células semelhantes a leveduras	Células epiteliais
Espermatozóides	Total de células nucleadas
Muco	Bactérias

Fig. 2 - Visão geral dos parâmetros de diagnóstico, pesquisa e fluido corporal fornecidos pelos analisadores da Série-UF

Para detectar partículas urinárias, dois canais de medição estão disponíveis na Série-UF, o canal Core (CR) e o canal Surface (SF). Enquanto o canal SF detecta partículas que não incluem ácido nucleico (RBC, cristais, etc.), o canal CR detecta partículas contendo ácido nucleico. A detecção adequada de partículas requer a coloração de partículas urinárias usando um agente diluidor e uma solução para a marcação por fluorescência das estruturas celulares.

No canal CR, as membranas dos leucócitos (Fig. 3) e as paredes celulares das bactérias são perfuradas pelo diluente. Essas pequenas perfurações das membranas permitem que o corante fluorescente entre no citoplasma e no núcleo e intercale em moléculas de ácido nucleico.

No canal SF, os componentes da membrana das partículas celulares, como as dos RBC, são corados pelo corante fluorescente sem afetar a integridade celular (Fig. 3).

As partículas coradas são então injetadas na célula de fluxo, onde o foco hidrodinâmico garante sua separação para permitir contagens precisas de partículas (Fig. 4).

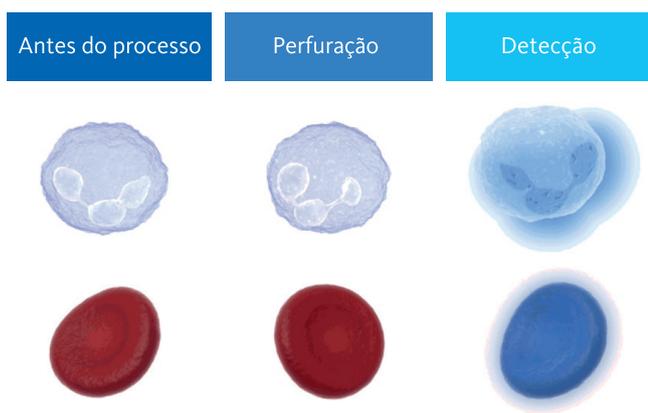


Fig. 3 - Reação partícula-dependente para partículas celulares que contém ácido nucleico, no canal CR (linha superior) e para partículas urinárias celulares e acelulares sem conteúdo de ácido nucleico (linha inferior).

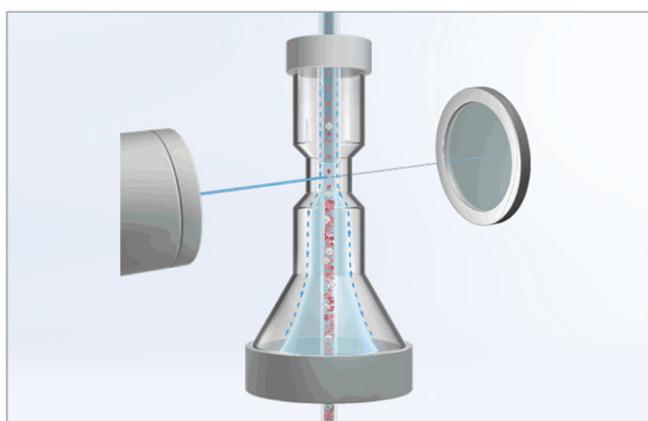


Fig. 4 - Foco hidrodinâmico de partículas de urina dentro da célula de fluxo dos instrumentos da Série-UF

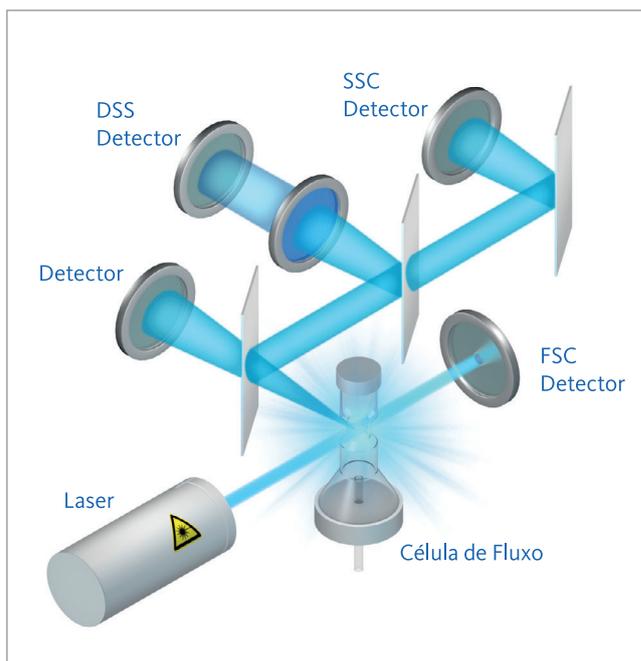


Fig. 5 - Citometria de fluxo fluorescente na Série-UF. Um raio laser é direcionado para a célula de fluxo, atingindo todas as partículas que passam. A luz de fluorescência é emitida a partir de elétrons excitados dos corantes fluorescentes e, dependendo do tipo de partícula individual, a luz do laser que se aproxima é caracteristicamente desviada. Os fotodetectores reconhecem individualmente as partículas e, com base nos padrões de sinal individuais, os sinais são plotados em um diagrama de dispersão.

Finalmente, a energia de um feixe de laser de 488 nm excita os elétrons do corante fluorescente anexados às partículas urinárias, elevando seu nível de energia. Após o relaxamento, os fótons são emitidos e detectados por diferentes fotodetectores (Fig. 5). Dependendo das subestruturas das diferentes partículas, a luz laser que se aproxima pode ser desviada e detectada por diferentes detectores, permitindo uma percepção do tamanho de cada célula (luz dispersa frontal; FSC), sua complexidade intracelular (luz dispersa lateral; SSC) e seu conteúdo de ácido nucleico (luz de fluorescência lateral; SFL). Os cristais são diferenciados dos RBC usando um filtro de despolarização (luz despolarizada lateral; DSS).

Melhorando a triagem para ITU

Para bactérias, informações quantitativas e qualitativas são fornecidas em menos de um minuto. Isso inclui uma contagem confiável de bactérias e informações sobre o status Gram.

Em um estudo representativo, o desempenho diagnóstico da contagem de células bacterianas da Série-UF foi identificado como 0,973 (AUC). Separado entre pacientes do sexo masculino e feminino, o desempenho diagnóstico foi estimado em 0,988 para pacientes do sexo masculino e 0,959 para pacientes do sexo feminino, respectivamente (Fig. 6; [11]).

A investigação de diferentes valores de corte revelou uma contagem de bactérias ≥ 58 células/ μ L como o valor mais sensível para descartar infecções do trato urinário com uma sensibilidade

de 99,4% (NPV 99,7%) e uma especificidade de 78,2% (PPV 65,4%) [11]. No entanto, valores de corte ideais devem ser estabelecidos em relação à população de pacientes prevalente.

Amostras suspeitas de infecções do trato urinário são destacadas diretamente pelo alarme UTI-Info, com base em bactérias e contagem de leucócitos para permitir diagnósticos de acompanhamento direcionados.

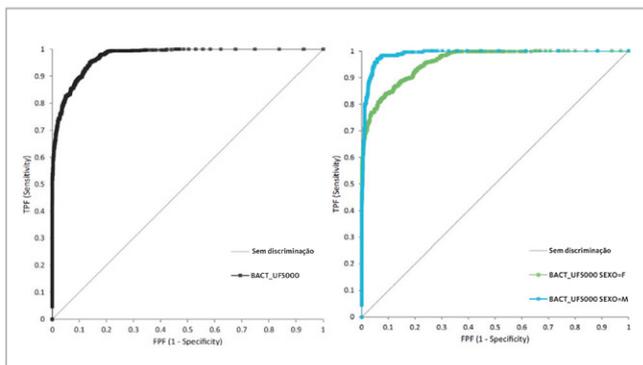


Fig. 6 - Precisão diagnóstica da contagem bacteriana da Série-UF em comparação com a cultura quantitativa de urina de 2.714 amostras de urina, incluindo 792 amostras positivas de bacteriúria, mostrando um crescimento bacteriano de $\geq 10^5$ CFU/mL (adaptado de [11]).

Informações sobre o status Gram

Com o alarme BACT-Info, a Série-UF fornece informações adicionais suspeitas sobre a afinidade do corante Gram para amostras positivas para bacteriúria.

Com base na distribuição do escatergrama de dispersão, as amostras suspeitas são destacadas com os respectivos comentários:

- **Gram positiva?**
Com base na distribuição, pode-se inferir que bactérias Gram-positivas estão presentes.
- **Gram negativa?**
Com base na distribuição, pode-se inferir que bactérias Gram-negativas estão presentes.
- **Gram pos/neg?**
Com base na distribuição, pode-se inferir que bactérias Gram positivas e Gram negativas estão presentes
- **Não classificado**
A classificação não fica clara na distribuição.

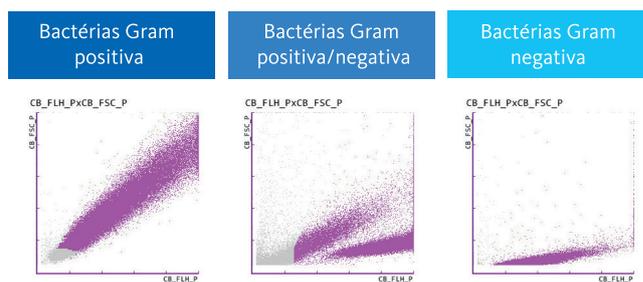


Fig. 7 - Detecção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por citometria de fluxo fluorescente no UF-5000

A diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas baseia-se na composição de suas paredes celulares. Devido à complexidade da parede celular Gram-positiva, menos corante fluorescente pode penetrar no citoplasma bacteriano, resultando em uma fluorescência do lado inferior. Além disso, uma quantidade maior de energia do laser está disponível para dispersão direta e leva - em combinação com fótons refletidos na parede celular mais espessa - a um sinal FSC mais alto para bactérias Gram-positivas.

As bactérias Gram-positivas são detectadas com uma sensibilidade de 78% e uma especificidade de 96%, enquanto que para as bactérias Gram-negativas, a sensibilidade e a especificidade atingem 89%. Esse alto grau de sensibilidade e especificidade na triagem pré-cultura para infecções do trato urinário pode permitir o início precoce da antibioticoterapia da ITU [12] e diagnósticos de acompanhamento mais direcionados.

Infecções fúngicas do trato urinário

As infecções fúngicas em adultos geralmente estão relacionadas a indivíduos imunocomprometidos ou a outras condições subjacentes, como diabetes. Portanto, a fungúria representa apenas cerca de 7% das infecções complicadas do trato urinário [3]. As infecções fúngicas do trato urinário se manifestam principalmente como infecções do trato urinário inferior e causam sintomas clássicos, enquanto as infecções fúngicas do trato urinário superior são raras, exceto em pacientes imunocomprometidos, causados por candidíase disseminada [13].

Juntamente com a exclusão da bacteriúria, uma publicação recente também demonstrou uma alta especificidade de 97,7% (NPV 98,8%) e uma boa sensibilidade de 89,5% (PPV 81,0%) para o parâmetro da célula tipo levedura [14], permitindo a exclusão de infecções fúngicas e diagnósticos direcionados para identificar a estratégia de tratamento correta [15].

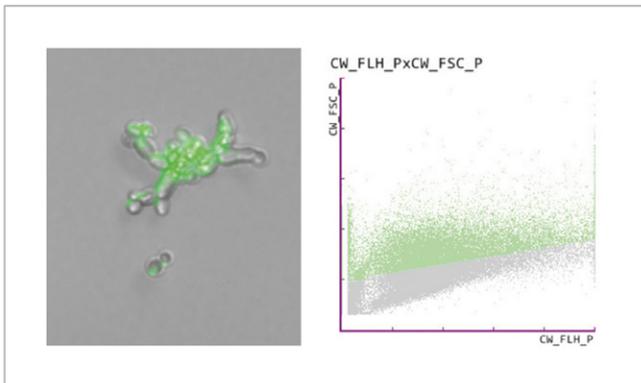


Fig. 8 - Células semelhantes a leveduras, detectadas por microscopia de fluorescência (esquerda) e no Sysmex Série-UF, exibidas no respectivo diagrama de dispersão (direita)

Distinguindo a ITU superior e inferior

A presença de células epiteliais tubulares renais (RTEC, abreviação em inglês) na urina é frequentemente um indicador de doença renal ou dano tubular. Uma vez que as RTEC cobrem todo o túbulo renal do segmento proximal ao distal, elas representam um potencial marcador diagnóstico de danos renais quando outros parâmetros ainda são imperceptíveis [16].

Como uma aplicação clínica potencial, a quantificação de RTEC em indivíduos com infecção confirmada do trato urinário demonstrou ser um indicador potencial de infecção do trato urinário superior (Fig. 9; [17]).

Com uma precisão diagnóstica de 0,923 (AUC), a contagem de RTEC supera claramente os marcadores conhecidos de infecção do trato urinário superior, como α_1 -microglobulina (0,735) e γ -glutamil transferase (0,586).

O potencial valor diagnóstico da quantificação do RTEC, no entanto, depende fortemente do manuseio e processamento adequados da amostra, pois sua estabilidade *in vitro* é prejudicada pelo tempo de armazenamento de duas horas ou mais, bem como pela temperatura ambiente e por um pH urinário ácido [17].

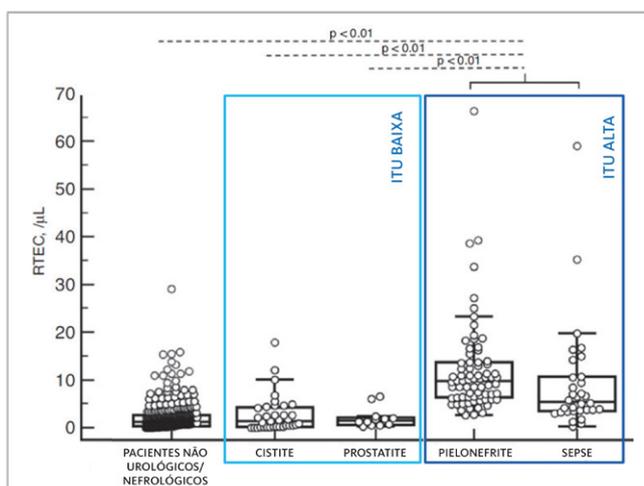


Fig. 9 - A célula epitelial tubular renal (RTEC) entre pacientes não urológicos/nefrológicos e pacientes com infecção confirmada do trato urinário superior ou inferior ([17] modificado)

Teste de suscetibilidade a antibióticos na Série-UF

O teste de suscetibilidade a antibióticos por difusão em ágar é um procedimento de diagnóstico obrigatório para identificar os antibióticos corretos para uma infecção persistente, a fim de induzir terapia direcionada e prevenir resistências antimicrobianas.

Resumidamente, amostras bacterianas são espalhadas em placas de ágar e discos de papel embebidos em antibióticos são colocados no ágar. Durante a incubação da placa, os antibióticos difundem-se radialmente e inibem o crescimento bacteriano, dependendo de sua eficácia antibiótica. Apesar de sua especificidade, este teste padrão-ouro de difusão de ágar tem um tempo de resposta alto de 18 a 48 horas [9].

Uma solução potencial para acelerar a decisão de tratamento com antibióticos foi relatada com a realização de testes de suscetibilidade a antibióticos na Série-UF. Alíquotas de caldo de crescimento microbiano pronto para uso foram suplementadas individualmente com diferentes antibióticos e inoculadas com as bactérias provenientes das amostras dos pacientes. Após incubação por até quatro horas, a concentração de bactérias nas diferentes culturas foi determinada na Série-UF. Uma sensibilidade de 83,3% (PPV = 100%) e uma especificidade de 100% (NPV = 91,3%) permitiram, por exemplo, a diferenciação de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes e suscetíveis à colistina em duas horas, suportada pelo UF-5000 (Fig. 11; [18]).

Abordagens alternativas combinam o diagnóstico de bacteriúria no UF-5000 com testes moleculares subsequentes para genes de resistência bacteriana [19] ou espectrometria de massa para identificar bactérias e mediadores da resistência a antibióticos [20], permitindo a instalação de uma antibioticoterapia direcionada em seis horas.

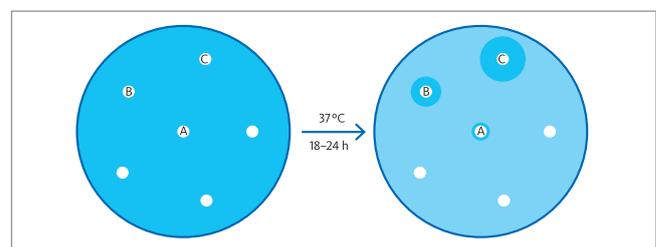


Fig. 10 - Apresentação esquemática do teste de suscetibilidade a antibióticos por difusão em ágar. Os diferentes diâmetros das zonas de inibição do crescimento ao redor dos discos de papel embebidos estão correlacionados com (A) ineficaz, (B) com eficácia média e (C) com antibióticos altamente eficazes.

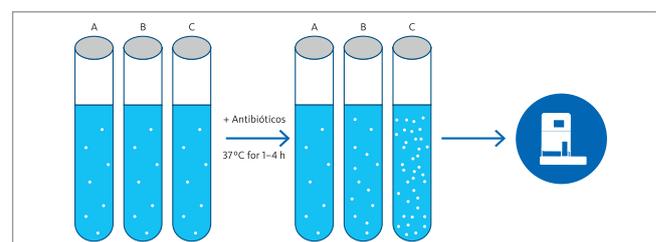


Fig. 11 - Teste alternativo de suscetibilidade a antibióticos no UF-5000 via monitoramento de crescimento de isolados bacterianos em caldo suplementado com diferentes antibióticos. A concentração de bactérias se correlaciona com (A) antibióticos altamente eficazes, (B) com eficácia média e (C) ineficazes.

Combate à resistência antimicrobiana com diagnóstico direcionado

A adaptação de microrganismos para resistir às ações de agentes antimicrobianos é amplamente conhecida como resistência antimicrobiana, um problema bem reconhecido da saúde pública do século XXI. A resistência antimicrobiana, no entanto, é um fenômeno que já foi relatado antes da descoberta da penicilina. Após anos de uso clínico extensivo do antimicrobiano Salvarsan para o tratamento da sífilis, foi observado um efeito decrescente do Salvarsan, bem como um aumento nos quadros clínicos mais graves da sífilis [21], indicando resistência antimicrobiana.

Desde então, o uso irracional de antimicrobianos (por exemplo, prescrições inapropriadas e automedicação), o uso extensivo de antimicrobianos na agricultura e agricultura industrial, e também o uso prolongado e generalizado de antibióticos na terapia e na profilaxia aumentaram o número de espécies resistentes de microrganismos [22].

Com o aumento da resistência antimicrobiana e o desenvolvimento lento de medicamentos antimicrobianos, a administração de antibióticos é de extrema importância. Sem ações adequadas e imediatas, o número de mortes causadas pela resistência antimicrobiana até 2050 superará as do câncer [23]. Assim, a Organização Mundial da Saúde anunciou uma crise global de saúde e lançou um plano de ação global [24] para combater a resistência antimicrobiana com as seguintes ações:

- Criar consciência e compreensão
- Fortalecer o conhecimento e a evidência científica
- Reduzir infecções através de medidas de higiene
- Otimizar o uso de antimicrobianos na saúde humana e animal

Aqui, o diagnóstico laboratorial é um fator importante, pois não apenas visa fornecer informações precisas para diagnósticos mais precisos e suporte à decisão clínica, mas também contribuirá para permitir um uso mais racional de antimicrobianos.

Resumo e conclusão

Considerando a quantidade total de suspeitas de infecções do trato urinário que finalmente se revelam negativas, um fluxo de trabalho de diagnóstico otimizado, incluindo o Sysmex Série-UF, pode melhorar a eficiência dos diagnósticos de laboratório excluindo infecções do trato urinário em um curto período (Fig. 12).

Além disso, o exame de urina moderno baseado em citometria de fluxo impede a prescrição cega de antimicrobianos desnecessários e, ao contrário, apoia um uso racional e direcionado, contribuindo assim para a administração antimicrobiana necessária.

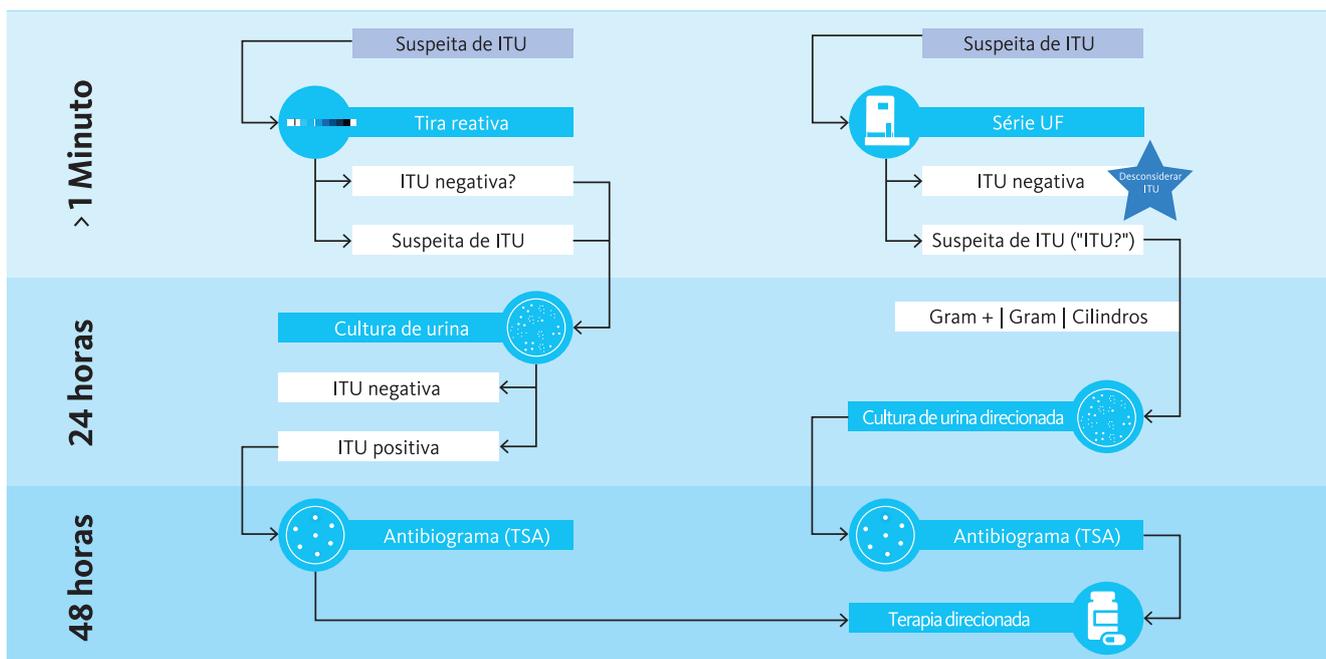


Fig. 12 - Visão geral do fluxo de trabalho para o diagnóstico de infecções do trato urinário sem (esquerda) e com análise automatizada de partículas de urina usando a Série-UF (direita). A Série-UF permite descartar ITU em menos de um minuto e reduz o acompanhamento diagnóstico desnecessário em até 80% do número total de casos suspeitos de ITU. Para possíveis amostras positivas para ITU ("ITU?"), o alarme "BACT Info" permite que diagnósticos mais direcionados identifiquem a presença e o tipo de infecção bacteriana. A exclusão de ITU em um estágio inicial também ajuda a reduzir a prescrição empírica de antibióticos e apoia a administração antimicrobiana.

Bibliografia

- [1] **Stamm WE, Norrby SR (2001):** Urinary tract infections: Disease paranormal and challenges. *J Infect Dis* 183 (Suppl. 1) S1–S4.
- [2] **Foxman B (2014):** Urinary Tract Infection Syndromes: Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors and Disease Burden. *Infect Dis Clin North Am* 28(1):1–13.
- [3] **Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M and Hultgren SJ (2015):** Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 13(5):269–284.
- [4] **Lane DR and Takhar SS (2011):** Diagnosis and Management of Urinary Tract Infection and Pyelonephritis. *Emerg Med Clin North Am* 29(3):539–552.
- [5] **Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E (2010):** The Diagnosis of Urinary Tract Infection – A Systematic Review. *Dtsch Arztebl Int* 107(21):361–367.
- [6] **Fischer V (2019):** Ein Schritt zur schnelleren Urinanalytik. *Xtra* 2:50–52. (article in German)
- [7] **Pujades-Rodriguez M, West RM, Wilcox MH, Sandoe J (2019):** Lower Urinary Tract Infections: Management, Outcomes and Risk Factors for Antibiotic Re-prescription in Primary Care. *E Clinical Medicine* 14:23–31.
- [8] **Wilson ML and Gaido L (2004):** Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis* 38(8):1150–1158.
- [9] **Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966):** Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disk method. *Am J Path* 45(4):493–496.
- [10] **Oyaert M and Delanghe JR (2019):** Progress in automated urinalysis. *Ann Lab Med* 39:15–22.
- [14] **Enko D, Stelzer I, Boeckl M, Derler B, Schnedl WJ, Anderssohn P, Meinitzer A and Herrmann M (2020):** Comparison of the diagnostic performance of two automated urine sediment analyzers with manual phase-contrast microscopy. *Clin Chem Lab Med* 58(2):268–273.
- [15] **Song D, Lee HJ, Jo SY, Lee SM and Chang CL (2018):** Selection of unnecessary urine culture specimens using Sysmex UF-5000 urine flow cytometer. *Ann Clin Microbiol* 21(4):75–79.
- [16] **Becker GJ, Garigali G, Fogazzi GB (2016):** Advance in urine microscopy. *Am J Kidney Dis* 67:954–964.
- [17] **Oyaert M, Speeckaert M, Boelens J, Delanghe JR (2020):** Renal tubular epithelial cells add value in the diagnosis of upper urinary tract pathology. *Clin Chem Lab Med* 58(4):597–604.
- [18] **Liste I, Cakar A, Sancak B, Hascelik G, Ozkuyumcu (2019):** The rapid detection of colistin resistance by using a fluorescence flow cytometry analyser. Poster 4301 presented on 'ASM Microbe 2019'.
- [19] **Wagner K, Mancini S, Ritter C, Böttger EC, Keller PM (2019):** Evaluation of the AID AmpC Line Probe Assay for Molecular Detection of AmpC-producing Enterobacterales. *J Glob Antimicrob Resist* 19:8–13.
- [20] **Oviaño M, de la Luna Ramírez C, Pedro Barbeyto L, Bou G (2017):** Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrobial Chemotherapy* 72(5):1350–1354.
- [21] **Silberstein S (1924):** Zur Frage der salvarsanresistenten Lues. *Arch Derm Syph* 147:116–130. (article in German)
- [22] **Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015):** Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health* 109(7):309–318.
- [23] **Review on Antimicrobial Resistance (2014):** Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf]
- [24] **World Health Organization (2015):** Global plan on antimicrobial resistance. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736>