

Fernanda Saad Rodrigues

**Aplicação da análise de séries temporais interrompidas a um “experimento natural”:
Avaliação do impacto da restrição de venda de antimicrobianos sem receita médica sobre
a etiologia e resistência antimicrobiana em infecções urinárias em Botucatu (SP)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de doutor em Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu

2022

Fernanda Saad Rodrigues

Aplicação da análise de séries temporais interrompidas a um “experimento natural”:
Avaliação do impacto da restrição de venda de antimicrobianos sem receita médica sobre a
etiologia e resistência antimicrobiana em infecções urinárias em Botucatu (SP)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para
obtenção do título de doutor em Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues, Fernanda Saad.

Aplicação da análise de séries temporais interrompidas a um "experimento natural" : avaliação do impacto da restrição de venda de antimicrobianos sem receita médica sobre a etiologia e resistência antimicrobiana em infecções urinária / Fernanda Saad Rodrigues. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
Capes: 40101096

1. Antibacterianos. 2. Infecções urinárias. 3. Testes de sensibilidade microbiana. 4. Resistência microbiana a medicamentos. 5. Análise de séries temporais.

Palavras-chave: Antibacterianos; Estudos de séries temporais; Infecções urinárias; Resistência microbiana a medicamentos; Testes de sensibilidade microbiana.

Agradecimentos

Agradeço ao **Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza**, pela orientação, paciência e auxílio ao longo de toda minha formação como infectologista, mestre e, agora, doutora.

Ao meu marido, **Bruno Minoru Miamoto**, por escolher me amar todos os dias, os bons e os ruins, os de sol e de chuva, com crises de ansiedade ou sem. Obrigada por ser meu porto seguro, minha família, meu amigo e meu amor.

Aos meus pais, **Cibele e Charles**, por serem meus maiores incentivadores ao longo da jornada da pós-graduação e não me deixarem desistir. Obrigada, mãe, por todas as revisões de texto e conselhos de orientadora pessoal.

Ao meu irmão **Rodrigo** e minha cunhada **Emília**, obrigada pelo melhor presente que vocês poderiam me dar. É uma honra ser a dinda desse pacotinho de amor que inicia uma nova jornada em nossa família. Gor, obrigada por ser o melhor irmão que o universo poderia me dar.

À **Helena Ribeiro Aiello Amat**, minha companheira de projeto, coleta de dados, escrita e publicação. Obrigada por toda a ajuda nessa jornada.

A todos que de alguma forma colaboraram para que este projeto fosse possível, obrigada.

Sumário

Resumo	6
Palavras-chave	6
ABSTRACT	7
KEY-WORDS	7
Introdução	8
Infecções do Trato Urinário	8
Uropatógenos e resistência em infecções do trato urinário comunitárias.....	9
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) número 44 de 2010.....	12
Resistência microbiana como um fenômeno no tempo e no espaço.....	14
Experimentos Naturais, Quasi-experimentos e Análises de Séries Temporais Interrompidas.....	15
Justificativa deste estudo.....	17
Objetivos do Estudo	18
Objetivo principal.....	18
Objetivos secundários.....	18
Metodologia	19
Local do Estudo	19
Princípios da análise estatística	20
Procedimentos operacionais estatísticos (I): Análise de Séries Temporais Interrompidas (ITS)	22
Procedimentos operacionais estatísticos (II): Análises de Box-Jenkins e Autorregressão	22
Desfechos interesses, critérios de inclusão e bancos de dados	24
Resultados e discussão	25
Análise descritiva e testes para sazonalidade.....	25
Alterações em incidência e etiologia das ITU após a RDC 44/2010	29
Alterações na resistência microbiana de uropatógenos após a RDC 44/2010.....	33
Escherichia coli	33
Enterobactérias não E. coli	43
Considerações sobre a associação entre uso de antimicrobianos e resistência em infecções da comunidade.....	47
Conclusão	49
Referências	50
APÊNDICE: ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO PLOS ONE	56

Resumo

São denominados “experimentos naturais” estudos que avaliam o impacto de uma intervenção natural ou artificial, externa ao controle dos investigadores. Em 26 de outubro de 2010, em esforço para conter a escalada da resistência de bactérias a antimicrobianos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) expediu a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 44, condicionando a venda desses medicamentos em farmácia à apresentação de receita médica. Em face desse “experimento natural”, foi utilizada a análise de séries temporais interrompidas para avaliar o impacto da medida sobre a etiologia e a resistência a antimicrobianos em agentes de infecção urinária adquirida na comunidade. O levantamento foi realizado junto ao laboratório de microbiologia do HCFMB, sendo considerados dois períodos: pré-intervenção (janeiro/2005 a outubro/2010) e pós-intervenção (novembro/2010-dezembro/2018). Os desfechos: proporção de agentes etiológicos e taxas de resistência aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica foram abordados por testes estatísticos usuais e por análises de séries temporais (modelos autorregressivos, ex.: ARIMA – Autoregressive Integrated Moving Average, análise de regressão segmentada). Como resultado, observamos sazonalidade das ITU, com predomínio no verão. A análise de ITS demonstrou diferentes resultados, nos quais se sobressaem: (a) redução significativa da proporção de enterobactérias não *Escherichia coli* e bacilos Gram-negativos não fermentadores; (b) impacto sobre evolução de taxas de resistência a aminoglicosídeos e cefalosporinas de 1ª. Geração, mas não a quinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol e cefalosporinas de 3ª. Geração. Em face dos resultados, não é possível no momento confirmar o impacto positivo da RDC 44 sobre a resistência em uropatógenos adquiridos na comunidade.

Palavras-chave

Estudos de séries temporais; Antibacterianos; Resistência microbiana a medicamentos; Infecções Urinárias.

ABSTRACT

“Natural experiments” are researches that assess the impact of a natural or artificial intervention, outside the control of researchers. On October 26, 2010, to contain the increase in the antimicrobial resistance, the National Health Surveillance Agency (ANVISA) issued the Collegiate Board Resolution (RCD) 44, conditioning the sale of these drugs in pharmacies to the presentation of prescription. The analysis of interrupted time series was used to assess the impact of the measure on the etiology and resistance to antimicrobials in agents of community acquired urinary tract infection. The survey was carried out at the HCFMB microbiology laboratory, considering two periods: pre-intervention (January / 2005 to October / 2010) and post-intervention (November / 2010-December / 2018). The outcomes: proportion of etiologic agents and rates of antimicrobials resistance most used in clinical practice were addressed by usual statistical tests and time series analyzes (autoregressive models, eg ARIMA - Autoregressive Integrated Moving Average, segmented regression analysis). As a result, we observed UTI seasonality, with predominance in the summer. The ITS analysis showed different results, which stand out: (a) significant reduction in the proportion of non-Escherichia coli enterobacteria and non-fermenting Gram-negative bacilli; (b) impact on the evolution of resistance rates to 1st aminoglycosides and cephalosporins generation, but not quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and 3rd cephalosporins generation. In view of the results, it is not possible at the moment to confirm the positive impact of RDC 44 on resistance in uropathogens acquired in the community.

KEY-WORDS

Time series analyses; Antimicrobials; Antimicrobials Resistance; Urinary Tract Infections

Introdução

Infecções do Trato Urinário

As infecções do trato urinário (ITU) se caracterizam pela presença de microrganismos em qualquer local do sistema urinário, incluindo uretra, bexiga, ureteres, pelve renal, rins, e estruturas adjacentes, como a próstata e o epidídimo, os quais se sobrepõe aos mecanismos de defesa e desencadeiam resposta inflamatória onde se instalam.¹

Historicamente, há descrição da existência da ITU no Ebers Papyrus no Egito em 1500 AC, sendo referenciada como “um calor emanado da bexiga”.² Somente na década de 30 houve desenvolvimento dos primeiros antibióticos e, anteriormente, o tratamento era realizado paliativamente com ervas diversas, sangria e repouso. Há 64 anos, Kass e Finland propuseram pela primeira vez a realização de urocultura quantitativa obtida do jato urinário médio para padronização diagnóstica da ITU.³ Posteriormente, em 1960 o mesmo Kass desenvolveu o conceito de bacteriúria significativa no contexto da gravidez.⁴

As manifestações clínicas das ITU variam consideravelmente, podendo se manifestar de forma não complicada como bacteriúria assintomática, uretrite ou cistite sintomática típica. As ITU complicadas são aquelas que se apresentam como pielonefrite aguda, acometendo os rins por via ascendente, hematogênica ou linfática, determinando maior gravidade. Habitualmente cursam com sintomas sistêmicos, que se não tratados adequadamente, podem resultar em choque séptico e óbito^{1,5,6}.

Os sintomas relativos ao trato urinário baixo incluem dor supra púbica, disúria, polaciúria e urgência urinária, além de alterações nos aspectos físicos da urina, tais como odor fétido, escurecimento e turvação. Na pielonefrite aguda podem ser encontrados, além dos achados já descritos, febre, náuseas, vômitos, dor lombar de forte intensidade com piora a punho percussão (Sinal de Giordano).^{1,7,8}

São fatores de risco conhecidos: o sexo feminino, as mulheres em fase de vida sexual ativa, utilização de diafragmas ou espermicidas, presença de gravidez, menopausa, cistocele ou incontinência urinária. Nos homens estão associadas à hipertrofia prostática, manipulação das vias urinárias e presença de doenças obstrutivas do trato urinário. Devemos lembrar ainda que

idosos, particularmente os institucionalizados, portadores de doenças crônicas e imunossuprimidos são mais propensos a adquirir ITU com maior frequência e gravidade.^{8,9}

Mais recentemente, descobriu-se que o trato urinário não é estéril e que abrigamos uma complexa rede microbiana cujo desequilíbrio potencialmente contribui para o aparecimento de sintomas do trato urinário inferior. Os distúrbios funcionais, a título de exemplo, mostram um microbioma com urotipos dominantes específicos, diversos daqueles existentes na urina de indivíduos saudáveis assintomáticos.¹⁰ No entanto, a contribuição deste microbioma para a ITU não está claramente esclarecida. Evidências sugerem que espécies comensais, como *Lactobacillus crispatus*, podem agir como protetores contra a colonização com microrganismos, mas ainda não é possível translacionar estes achados tecnológicos de metagenômica para a clínica¹¹, embora em futuro próximo especula-se que tenhamos novas formas de diagnóstico e de estudar a sensibilidade dos uropatógenos.¹²

O exame considerado padrão ouro de diagnóstico é a urocultura, que provê a identificação do microrganismo responsável, o número de colônias presentes e fornece no antibiograma a sensibilidade do germe cultivado às diversas drogas, orientando o tratamento. Considera-se positiva a presença de 10^5 (cem mil) unidades formadoras de colônias bacterianas por mililitro de urina.^{5,12}

Obviamente, é preciso considerar os métodos microbiológicos e os critérios utilizados por cada laboratório, por exemplo, como é feito o transporte, a identificação do patógeno e, principalmente a padronização do teste de sensibilidade antimicrobiano, que pode variar em diferentes países e entre instituições.^{1,12,13}

Uropatógenos e resistência em infecções do trato urinário comunitárias

Os patógenos implicados na etiologia de ITU e seu padrão de resistência diferem de acordo com o país estudado e mesmo entre regiões, estados e municípios. Além da geografia, também têm impacto os fatores próprios do paciente, como idade, sexo, comorbidades, presença de imunossupressão. É sobretudo relevante o local de aquisição: se na comunidade ou em ambiente de saúde.^{14,15}

A infecção comunitária é aquela, conforme Portaria 2.616 de 12 de maio de 1998 do Ministério da Saúde, “constatada ou em incubação no ato da admissão do paciente no hospital,

desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital”. Além disso, esse paciente não deve ter registro recente de internação hospitalar”.¹⁶

Fato é que a descoberta e popularização dos antimicrobianos revolucionou a medicina e colaborou para a redução dramática da mortalidade por quadros infecciosos no Brasil e no mundo.¹⁷ No entanto, foi rapidamente seguida pelo desenvolvimento de resistência por bactérias clinicamente relevantes. Na década passada, teorizou-se que entraríamos em uma era “pós-antimicrobiana”, em que não haveria tratamento eficaz contra a maioria dos patógenos.¹⁸ Uma aceleração no desenvolvimento e comercialização de novos antimicrobianos nos últimos anos tem renovado o otimismo na comunidade científica.¹⁹ No entanto, o contínuo desenvolvimento de fenótipos de resistência mantém o fantasma da catástrofe “pós-antimicrobiana” em nosso horizonte.

Nas últimas duas décadas as taxas de resistência aumentaram exponencialmente, ao passo que a capacidade de desenvolver novos antimicrobianos foi progressivamente reduzida,¹⁹ portanto, é essencial monitorar o comportamento frente aos antimicrobianos e conhecer o padrão de resistência dos microrganismos.

Embora grande parte dos microrganismos multidroga-resistentes (MDR) seja identificada em infecções hospitalares,¹⁹ o problema não se restringe àquele ambiente. Exemplos de agentes MDR implicados em infecções comunitárias são os pneumococos (*Streptococcus pneumoniae*) resistentes à penicilina,²⁰ gonococos (*Neisseria gonorrae*) resistentes a penicilinas e quinolonas,²¹ e o temido CA-MRSA (*Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*).^{22,23}

Analisado de uma perspectiva histórica, uso intenso de antimicrobianos tem exercido grande impacto sobre a etiologia e a resistência nas ITU adquiridas na comunidade (ITU-AC). Em termos globais, observou-se o aumento das infecções por enterobactérias como *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* Esse fenômeno envolveu a disseminação de linhagens MDR, tais como as produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*), enzimas capazes de inativar penicilinas e cefalosporinas.^{24,25}

Em revisão sistemática global, incluindo o Brasil, sobre fornecimento de antimicrobianos sem receita médica, foi constatado que 62% de dispensação ocorre nesta condição, sendo 78% na América do Sul. Fluoroquinolonas e penicilinas foram as classes mais fornecidas para tratamento de doenças autolimitadas como ITU (68%) e infecções respiratórias altas (67%).

Muito embora 23 dos 24 países tenham leis restritivas ao fornecimento de antibióticos sem receita médica, há indícios de que elas não são efetivamente cumpridas.²⁶

É importante notar que o aumento da resistência é observado em todo o espectro das ITU-AC, englobando bacteriúrias assintomáticas, infecções do trato urinário baixo e pielonefrites.^{27,28} Dados de um sistema multicêntrico de vigilância da resistência (projeto SENTRY) divulgados em 2006 mostraram que *Escherichia coli* continua a ser o agente etiológico predominante, causando 66% das ITU-AC. No entanto, houve participação significativa de *Klebsiella spp.* (7%), *Proteus mirabilis* (6%), *Enterococcus spp.* (6%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5%). O dado mais preocupante dizia respeito à resistência a antimicrobianos entre os patógenos: 54% para ampicilina, 40% para trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMX) e 22% para ciprofloxacina.²⁷

Em estudo realizado em Curitiba (PR), isolados de *E. coli* apresentaram altas taxas de resistência a ampicilina, TMP/SMX e quinolonas.²⁸ O mesmo estudo identificou aumento na proporção de casos em indivíduos do sexo masculino, especialmente nas faixas etárias mais elevadas. Nos dois últimos anos, surgiram relatos de ITU-AC causadas por enterobactérias produtoras de ESBL, fenômeno que elimina as cefalosporinas como agentes terapêuticos e aumenta a necessidade de terapia hospitalar com antimicrobianos de amplo espectro, tais como os carbapenêmicos.^{29,30,31}

Em Florianópolis (SC) foram avaliadas 1035 uroculturas positivas de pacientes ambulatoriais. A amostra era predominantemente de pacientes femininas (89,66%) com achado de bactérias Gram-negativas, especialmente a *Escherichia coli* (77,10%). *Proteus mirabilis* foi significativamente mais prevalente em homens e meninos de 1 a 5 anos. A *E. coli* foi significativamente mais prevalente no sexo feminino e apresentou maior perfil de resistência. As quinolonas foram associadas com maiores frequências de resistência em homens e entre idosos.³²

Como se pode concluir, o fenômeno parece ocorrer em todo o território nacional, sendo bem caracterizado em estudos de diferentes Regiões do Brasil.²⁷⁻³¹

Do que foi apresentado acima, depreende-se a relevância da resistência bacteriana como problema de saúde pública. Nesse contexto, medidas têm sido tomadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o objetivo de reduzir ou limitar a emergência e disseminação de bactérias MDR.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) número 44 de 2010

A ANVISA foi criada em 1999 pela Lei número 9782 como uma autarquia sob regime especial, que tem sede e foro no Distrito Federal, mas se capilariza em todo território nacional. É agência reguladora vinculada ao Ministério da Saúde do Brasil, mas gozando de relativa autonomia administrativa.³³ Além de regular a produção e comercialização de medicamentos (incluindo os antimicrobianos), a ANVISA incorporou ações programáticas como o controle da infecção hospitalar e da resistência bacteriana.³³

Entre 2009 e 2010, o Brasil viveu a introdução e rápida disseminação de um novo fenótipo de resistência bacteriana, presente principalmente em *Klebsiella* spp., mas também em outras enterobactérias, tais como *E. coli* e *Enterobacter* spp. Tratava-se da KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), uma enzima capaz de destruir os carbapenêmicos, uma das últimas opções restantes para o tratamento de agentes MDR.^{34,35,36} Até aquele ano, embora houvesse a recomendação de venda de antimicrobianos com receita médica, não havia controle sobre a dispensação desses medicamentos.

Um estudo de 2005 realizado em Joinville (SC) demonstrou uma situação preocupante. Das 136 farmácias existentes na cidade, 107 foram visitadas por atores e, destas, 58% venderiam antibiótico sem receita médica para uma situação hipotética de rinosinusite e, com a insistência do comparador, esta porcentagem subia para 74%. Os agentes mais dispensados eram amoxicilina, azitromicina, TMP/SMX, cefalexina, eritromicina e ampicilina. A maior parte deles faz (ou fazia) parte do arsenal terapêutico das ITU-AC.³⁶

A emergência das KPC e sua repercussão popular criaram um ambiente propício para que a ANVISA implementasse medidas restritivas à venda de antimicrobianos, tendo em vista seu uso abusivo, muitas vezes incorreto e não controlado.

Em 26 de outubro de 2010 foi expedida a RDC 44³⁷, que “dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências.” Esta RDC foi complementada posteriormente pela RDC 20 de 05 de maio de 2011, que, por sua vez, “estabelece os critérios para a prescrição, dispensação, controle, embalagem e rotulagem de medicamentos à base de

substâncias classificadas como antimicrobianos de uso sob prescrição, isoladas ou em associação.”^{37,38}

A partir de então, passou-se a exigir a retenção da segunda via da receita médica (ou odontológica) no ato da venda de antimicrobianos, com a devolução da primeira via ao paciente. Além disso, apresentava obrigatoriedades relacionadas à receita: legibilidade, ausência de rasuras, nome, assinatura e registro profissional do médico ou dentista. Por fim, tornou-se mandatório às farmácias a identificação do usuário e do comprador do medicamento.³⁹ Inaugurou-se assim, uma nova fase na utilização de antimicrobianos por pessoas não internadas.

Não resta dúvida sobre o quanto foram oportunas as RDC 44/2010 e RDC 20/2011. Estudos publicados recentemente demonstraram sua efetividade em frear a venda de antimicrobianos – ainda que com algumas variações entre as macrorregiões do país (**Figuras 1 e 2**).^{40,41}

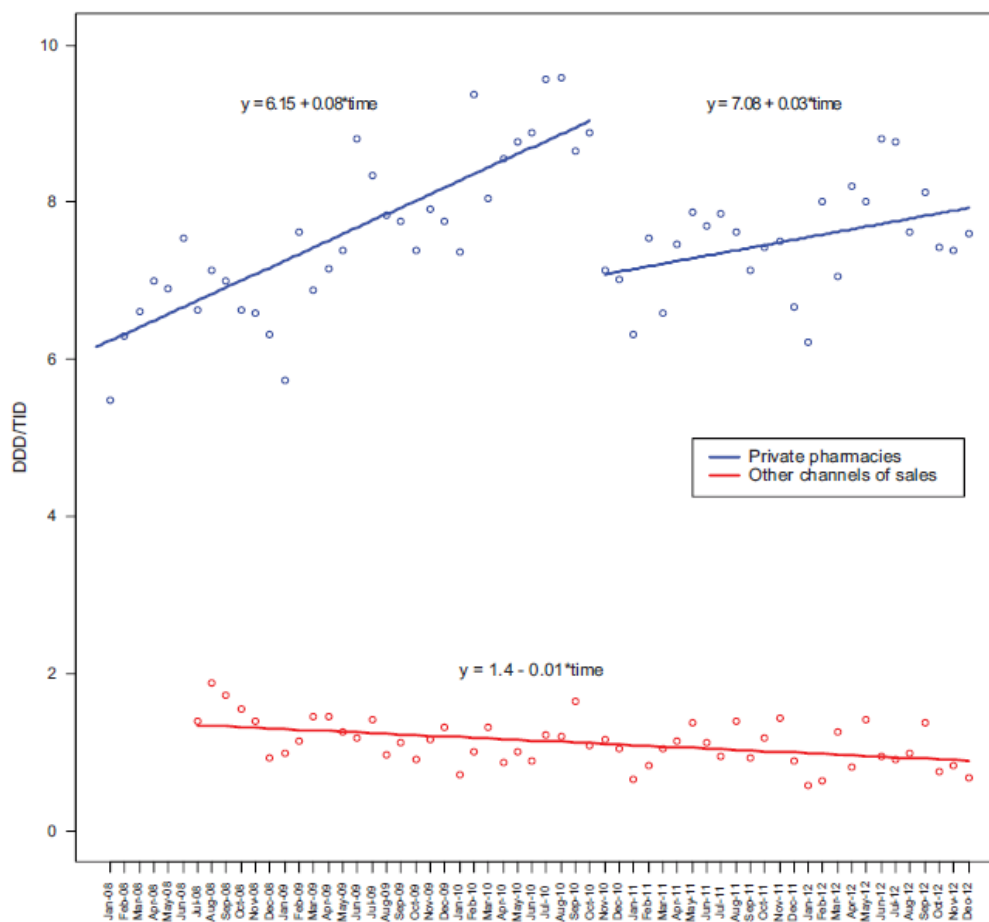


Figura 1. Impacto da RDC44 /2010 sobre venda de antimicrobianos em farmácias (linha azul). Fonte: Gráfico reproduzido da referência 47, com permissão dos autores.

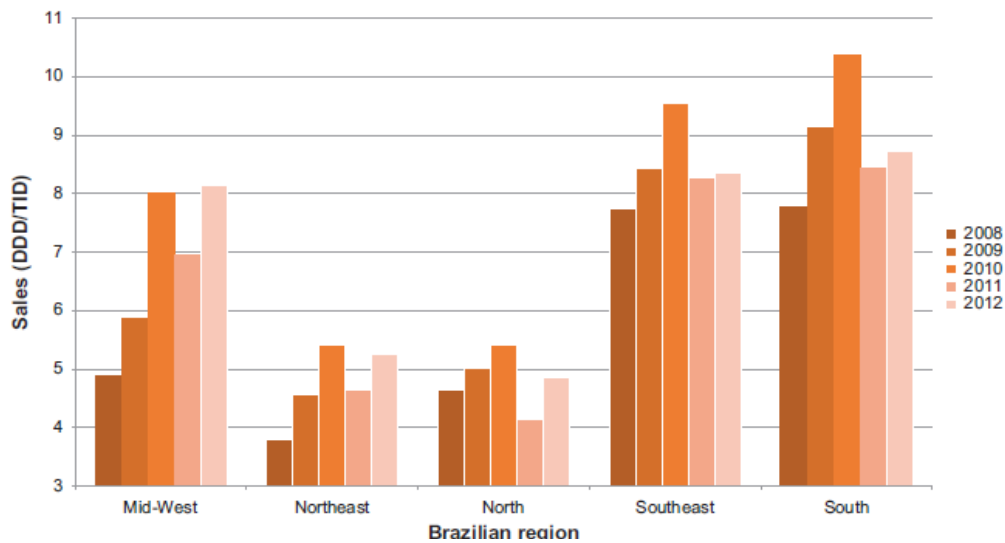


Figura 2. Variação na alteração da venda total de antimicrobianos nas diferentes macrorregiões do Brasil. Fonte: Gráfico reproduzido da referência 47, com permissão dos autores.

No entanto, a complexidade molecular e ecológica dos microrganismos MDR inclui outros fenômenos facilitadores da sua disseminação (além do uso de antimicrobianos), tais como a virulência, patogenicidade e vulnerabilidade de grupos populacionais. Em resumo, a epidemiologia da resistência microbiana abrange fenômenos ecológicos e coletivos.⁴²

Torna-se, portanto, necessário identificar o impacto que essa medida teve sobre a resistência em infecções bacterianas adquiridas na comunidade. Entre essas, as ITU-AC são certamente aquelas para as quais há maior quantidade de informação microbiológica disponível. Esse fato, somado a sua alta incidência e relevância clínica, faz dessas infecções marcadores preferenciais da evolução da resistência em patógenos comunitários.

Resistência microbiana como um fenômeno no tempo e no espaço

Abrindo um parêntese neste tema, enfatizamos a necessidade de compreender a resistência microbiana (e as infecções bacterianas em si) como fenômenos condicionados pelos três vetores da epidemiologia: tempo, espaço e populações.⁴³

As populações vulneráveis às ITU já foram discutidas acima: sexo feminino, alterações anatômicas geniturinárias, imunossupressão.^{5,8} Também para a presença de resistência antimicrobiana aos uropatógenos, referimos os procedimentos invasivos urológicos, a aquisição da infecção em serviços de saúde e o uso prévio de antimicrobianos.^{9,10}

A distribuição espacial da resistência tem sido utilizada de forma crescente como ferramenta para compreensão epidemiológica, vigilância e controle.⁴⁴ Abordagens variam de mapeamentos da interface entre animais e humanos (“one health”), estudo dos deslocamentos populacionais e viagens internacionais como dispersores de fenótipos (geografia médica)⁴⁵ até a modelagem de simulação complexa de disseminação espacial (“agent-based modelling”).⁴⁶ Um interessante estudo de Kiffer e colaboradores encontrou correlação espacial entre dispensação de antimicrobianos e incidência de ITU por enterobactérias resistentes no município de São Paulo.⁴⁷

De interesse mais imediato ao presente trabalho é a abordagem do vetor tempo: tendências seculares^{48,49}, sazonalidade^{50,51} e alterações bruscas⁵² (associadas ou não a intervenções). De fato, uma intervenção como a que aqui nos interessa (a restrição de venda de antimicrobianos sem receita) não se dá sobre um fenômeno estático. Ao contrário, deve ser avaliada em conjunto com a variação temporal da incidência de infecções e resistência.

Experimentos Naturais, Quasi-experimentos e Análises de Séries Temporais Interrompidas

O estudo aqui apresentado pode ser caracterizado como um “experimento natural”⁵⁴ com emprego de diferentes modelos de análises de séries temporais. Para abordá-lo de forma apropriada, empregamos a análises de séries temporais interrompidas (ITS, *Interrupted Time Series*), modelos de Box-Jenkins⁵⁶ e autocorrelação temporal.⁵⁷

Denominam-se “experimentos naturais” estudos em que se avalia o impacto de uma intervenção natural ou artificial, **porém externa ao controle dos investigadores**, sobre indivíduos ou populações.⁵⁴ No clássico livro de Campbell, hoje editado por Shadish e colaboradores, denominado *Experimental and Quasi-experimental Designs for Generalized Casual Inference*, os autores, que introduziram essas técnicas inicialmente em estudos comportamentais e ciências sociais, só posteriormente os estendendo para a área médica. Tais autores chamam a atenção para dois aspectos:

- Experimentos naturais não são verdadeiros “experimentos”. Isso decorre do fato de que, na prática experimental (o que inclui os ensaios clínicos randomizados), o pesquisador manuseia as causas para observar os efeitos. Como vimos acima, alguém (a natureza, os legisladores, uma revolução) são intervenções externas à atuação da equipe da pesquisa. Poderiam então ser estudados entre os métodos epidemiológicos observacionais.

- No entanto, em termos pragmáticos, há uma intervenção bem caracterizada, o que assemelha a um quasi-experimento, no qual os pesquisadores ativamente dividem (embora não randomizando) participantes em grupo sob intervenção e grupo controle. Portanto, para termos de condução e análise, os “experimentos naturais” estão mais próximos aos quase-experimentos (intervencionistas) que de estudos puramente observacionais, como coorte e caso-controle.

Os autores mantêm em seu livro clássico a abordagem conjunta dos experimentos naturais e quasi-experimentos. Enfatizamos que a ambos falta pelo menos um dos pré-requisitos que definem o “experimento por excelência em saúde humana”, o ensaio clínico randomizado (ECR). Estes requisitos são: pré-teste, grupo controle, escolha aleatória do grupo de intervenção e pós-teste. Quando falta um desses itens ao estudo, ele é denominado *quasi-experimental*.⁵⁸

Portanto, tanto experimentos naturais quanto estudos quase experimentais comparam populações com exposições diferentes, seja porque foram incluídas no seguimento **antes ou depois** de uma intervenção⁵⁹, seja porque compararam simultaneamente duas populações não randomizadas (ou, mais eticamente, impossíveis de ser randomizadas) para exposição ao fator de risco. Como exemplo, podemos citar um estudo sobre profilaxia de infecções de cateteres venosos centrais em hemodiálise usando, comparando terapia de *lock* com taurolidina (em um hospital) e a combinação cefazolina-gentamicina (em outro), em que não houve randomização e sim preferência das equipes de controle de infecção por esta ou aquela abordagem.⁵⁹ De modo que, se faltam a estes estudos (experimentos naturais e quasi-experimentos) o rigor controlado dos ECR, sua proximidade com situações de vida real pode fornecer uma validade externa nem sempre vistas em estudos com voluntários bastante diferentes dos “pacientes reais”.

A abordagem de experimentos naturais tem sido feita em diferentes âmbitos das ciências sociais, economia, psicologia e epidemiologia.⁶⁰ A intervenção pode ser realmente “natural” (ex.: impacto do terremoto no Haiti sobre a criminalidade)⁶¹ ou “artificial” (ex.: impacto da proibição do tabagismo na cidade de Helena [EUA] sobre a incidência de infarto agudo do miocárdio).⁶³ A Lei Seca para motoristas no Brasil tem sido estudada em seu impacto sobre acidentes e mortes em trânsito.⁶⁴ Ações do atual governo como facilitar o acesso às armas de fogo e reduzir controle de trânsito em estradas são “experimentos naturais” à espera de

pesquisadores engajados. Porém informações preliminares são preocupantes¹² E não podemos esquecer que a pandemia de covid-19 trouxe o mais impactante experimento natural do último século, com impactos sobre economia, nutrição, saúde e distúrbios psicológicos, todos extensamente abordados na atualidade.⁶⁵

Justificativa deste estudo

A RDC 44/2010 partiu de um argumento não diretamente relacionado (a emergência das infecções por enterobactérias produtoras de carbapenemases), com grande mortalidade hospitalar e impacto na imprensa⁵³, para estabelecer um “momento” de reflexão e instituir o controle sobre uso ambulatorial de antimicrobianos. Não resta qualquer dúvida sobre o senso de oportunidade e a necessidade dessa legislação.

No entanto, e apesar das abordagens preliminares relativamente otimistas^{40,41}, ainda são escassas as análises do impacto da RDC 44/2010 sobre a resistência a antimicrobianos em infecções adquiridas ou diagnosticadas na comunidade, em especial no caso das ITU. Em nossa opinião, esta política pública representa um “experimento natural” (no sentido em que o definiremos na seção de métodos) relevante, e a análise de seus muitos possíveis desfechos fornece um *feedback* às entidades governamentais envolvidas na prevenção e controle da resistência microbiana.

¹ <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-57844477#:~:text=Aumento%20de%20homic%C3%ADdios,provocados%20por%20armas%20de%20fogo.>

² <https://autopapo.uol.com.br/noticia/mudancas-na-cnh-multas-de-transito-bolsonaro/>

Objetivos do Estudo

Objetivo principal

- Identificar o impacto da implementação da restrição de venda de antimicrobianos sem retenção de receita médica sobre a etiologia e a resistência de uropatógenos em infecções do trato urinário identificadas na comunidade na Região de Botucatu, interior do Estado de São Paulo.

Objetivos secundários

- Descrever padrões etiológicos e de resistência microbiana nos uropatógenos identificados na comunidade.
- Analisar tendências temporais seculares e sazonalidade na incidência, etiologia e resistência aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento das infecções do trato urinário diagnosticadas na comunidade.

Os municípios do Polo Cuesta mantêm convênio com o HC-FMB (um complexo de três unidades que totaliza aproximadamente 800 leitos) para realização de exames microbiológicos de pacientes assistidos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Não temos dados recentes sobre a proporção da população atendida pelo SUS, mas estudo da década de 2000 apontavam para um mínimo de 67%. Com a disponibilização, a partir de 2011, da atividade de pronto-socorro e pronto-atendimento municipal de Botucatu, é possível ter ocorrido aumento nesse percentual.

Princípios da análise estatística

Uma das ferramentas estatísticas usualmente empregadas para análise de experimentos naturais é a “análise de séries temporais interrompidas” (interrupted time series, ITS). Descrita de forma resumida, uma ITS é uma série temporal da qual se conhece (ou determina) o exato momento de intervenção.⁴⁷

As análises envolvem não somente a mera comparação de taxas antes e depois (que não é apropriada para medidas feitas ao longo do tempo), mas o estudo de dois impactos: (a) o imediato, que pode ser um crescimento ou decréscimo abrupto; (c) o de longo prazo sobre a tendência, que pode acompanhar ou ser inverso ao anterior. A **figura 4** apresenta possíveis modelos de impacto de intervenções em curto ou médio prazo na ocorrência de um desfecho (seja ele ou não vinculado à saúde).

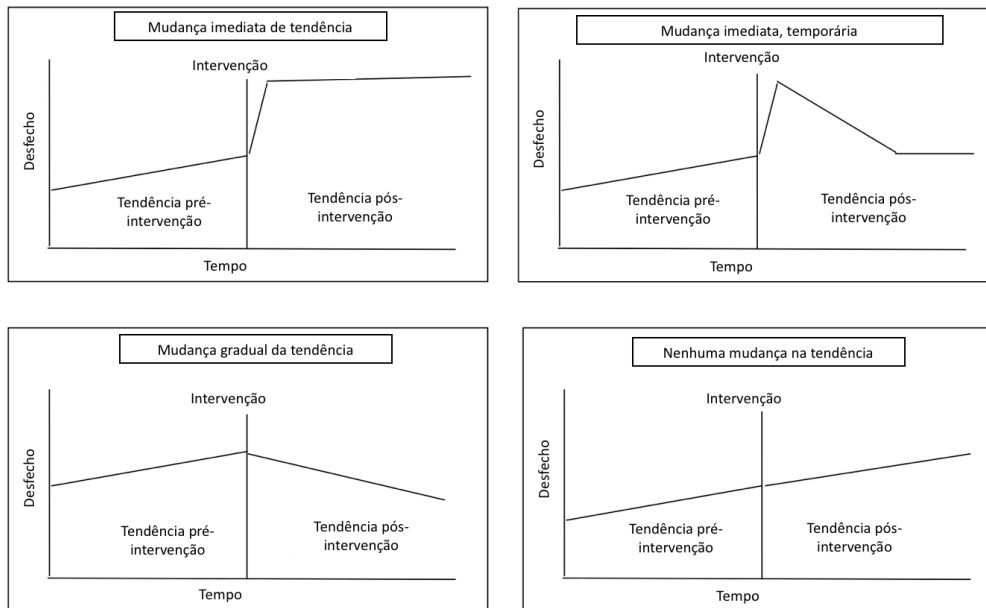


Figura 4. Exemplos de padrões de alteração em tendências de séries temporais após uma intervenção (Fonte: Busca Google, site original não localizável).

O procedimento básico aplicado para análises de séries temporais interrompidas é a análise de regressão segmentada.⁶⁶ Essa análise parte de uma equação derivada daquela basicamente utilizada em modelos de regressão múltipla.⁶⁷ Porém, para calcular os coeficientes de regressão, utiliza isoladamente e a variável tempo (o correr do estudo), intervenção (momento da introdução da medida de controle ou, ao contrário, da ocorrência de uma catástrofe) e uma terceira variável que agrupa tempo e intervenção, medindo o impacto sobre a angulação da tendência temporal. Vejamos abaixo⁶⁶:

$$\hat{Y}_t = \beta_0 + \beta_1 \times \text{tempo}_t + \beta_2 \times \text{intervenção}_t + \beta_3 \times \text{tempo após intervenção} + e_t$$

Onde \hat{Y}_t =desfecho, β_0 =nível basal do desfecho no início da série, β_1 =tendência temporal de base, β_2 =mudança de nível no segmento pós-intervenção, β_3 =mudança na tendência temporal no segmento pós-intervenção e e_t = erro.

Tais modelos podem ser tornados mais complexos (mas por outro lado mais realistas) com o acréscimo de outras variáveis, tais como estação do ano e condições meteorológicas. Por

fim, podem ser complementadas pelos já citados modelos de Box-Jenkins e autocorrelação temporal.

Procedimentos operacionais estatísticos (I): Análise de Séries Temporais Interrompidas (ITS)

Em nossa análise inicial, utilizamos ITS para identificar padrões de resistência em dois momentos.^{58,63,66} Foram considerados dois períodos para análise: (a) pré-intervenção (janeiro/2005 a outubro/2010), e pós-intervenção (outubro/2011 a dezembro/2018).

As análises foram precedidas por comparação simples “antes e depois” de taxas agregadas (IPP e PIR) para os períodos, utilizando o mid-P exact test no software OpenEpi (Emory University, Atlanta, GA, USA). A seguir, as séries temporais foram submetidas à ITS análises para comparação de níveis e inclinação da série temporal nos períodos do estudo.

Para testar os resultados frente a modelos lineares e loglineares (afetados pelos denominadores), realizamos sequencialmente a ITS utilizando regressão de linear (mostra nas figuras) e de Poisson (detalhada com coeficientes nas tabelas). Nestes últimos modelos, incluímos as estações do ano, para controlar o impacto da RDC 44/2010 contra confundidores sazonais.

Procedimentos operacionais estatísticos (II): Análises de Box-Jenkins e Autorregressão

Incidências de um defecho específico em meses sequenciais não podem ser consideradas dados independentes. Em outras palavras, o resultado de um mês pode impactar naquele seguinte, e mesmo (nos eventos sazonais) tal correlação pode se der em intervalos de um ano. Entre estes exemplos podemos incluir a venda de flores em dia das mães e dos namorados, as viagens a pontos turísticos nas férias escolares e os empregos temporários do Natal. Desta forma, a maioria dos métodos aplicados para comparar médias, medianas e proporções – os testes do Chi-Quadrado, Exato de Fischer, T de Student, U de Mann-Whitney ou Análise de Variância – são inapropriados para abordar mudanças de ocorrência ao longo do tempo.

Uma alternativa para isso, já citada acima, são as análises de ITS. Porém o modelo autorregressivo desenvolvido por Box & Jenkins⁵⁰, ARIMA (*autoregressive integrated moving average*), aborda a série a partir de três parâmetros: “p” é a ordem de defasagens, ou quantos períodos passados anteriores esperamos que influam no desfecho em um mês de interesse; “d” é o grau de diferença entre o valor atual e o de; e “q” é a ordem do modelo de média móvel (se considerarmos q=2, ele trabalhará com a média móvel dos últimos dois meses). De forma que a notação de um modelo é $\boxed{\text{ARIMA (p, d, q)}}$, e a sua adequação estatística depende da significância dos componentes, que representa bom ajuste dos modelos às séries temporais.

Para abordar sazonalidade, o modelo é sofisticado e chamado SARIMA (*seasonal autoregressive integrated moving average*). A diferença é que, aos parâmetros autorregressivos imediatos, somam-se os sazonais (para os mesmos períodos do ano anterior) P, D e Q, com significados similares. A notação do modelo é $\boxed{\text{SARIMA (p, d, q) (P,D,Q)m}}$ e este m final significa o número de estações que cada valor representa (será 12 se nossa série temporal for mensal, 4 se usarmos como unidades de estações do ano).

Em nossas abordagens, utilizaremos preferencialmente (sempre que for possível identificar um modelo analisável o modelo $\boxed{\text{SARIMA (1,0,1) (1,0,1)12}}$. Também foram aplicados modelos de Regressão de Poisson para identificar associação da incidência e resistência com as estações do ano.

Desfechos interesses, critérios de inclusão e bancos de dados

Pode parecer incomum apresentar o modelo analítico anteriormente à abordagem para obtenção dos dados e construção das séries temporais. Porém acreditamos que, uma vez que o racional teórico da busca de dados foi determinado *a priori* pelos princípios metodológicos expostos acima, também aos examinadores e demais leitores será mais fácil compreender as etapas descritas a seguir.

Foram revisadas culturas de urina (uroculturas) coletadas em serviços ambulatoriais e/ou nas primeiras 48 h de internação hospitalar. O critério de inclusão no estudo foi a presença de urocultura positiva em pacientes com as condições descritas acima. Critérios de exclusão foram internações prévias nos últimos seis meses (identificadas no sistema de controle de pacientes do HCFMB)⁶; as duplicidades, definidas como identificação da mesma espécie em culturas coletadas com intervalo inferior a 30 dias; e as uroculturas mistas sugestivas de contaminação.

As “unidades de pesquisa” foram taxas mensais incidência total (definida sobre denominadores populacionais, estimados com crescimento linear a partir dos Censos de 2000 e 2010 e da Estimativa IBGE para população nos municípios em 2018).

Os indicadores de interesse foram:

- Incidência total e de uropatógenos e perfis de resistência específicos (por 100.000 habitantes).
- Proporção de espécies (PP=patógeno de interesse / total de uropatógenos).
- Proporção de isolados resistentes (PIR=isolados do patógeno “X” resistentes a antimicrobiano de interesse / total de isolados do patógeno “X”).

⁶ É relevante apontar aqui que esse critério de eliminar internações e procedimentos anteriores pode ter perdido dados de admissões em outros hospitais. Porém foi feita busca em prontuários para minimizar ao máximo esse risco. Ainda assim, preferimos o termo “infecções diagnosticadas na comunidade” (Community-onset) a “adquiridas na comunidade” (Community-acquired).

Resultados e discussão

Análise descritiva e testes para sazonalidade

Ao todo, foram analisadas 40.814 culturas coletadas entre 2005 e 2018. Obtemos incidência acumulada no período de 13.588 por 100.000 habitantes, se considerarmos a população de Botucatu, que representa em torno de 80% dos pacientes atendidos no HCFMB. Os pacientes incluídos no estudo foram aqueles atendidos em algum serviço da Unesp ou que para ela envia exames microbiológicos, sejam estes ambulatoriais terciários ou em pronto atendimento.

Os pacientes atendidos em nossa unidade de estudo são advindos de serviços primários e secundários, que necessitam de cuidados terciários, com múltiplas comorbidades e tratamentos prévios, muitas vezes submetidos a uso prévio de antimicrobiano em seus municípios e em outras internações das quais não temos conhecimento. Ainda, a sua maioria não utiliza antimicrobianos adquiridos em farmácias, mas sim aqueles fornecidos pelo Sistema Único de Saúde.

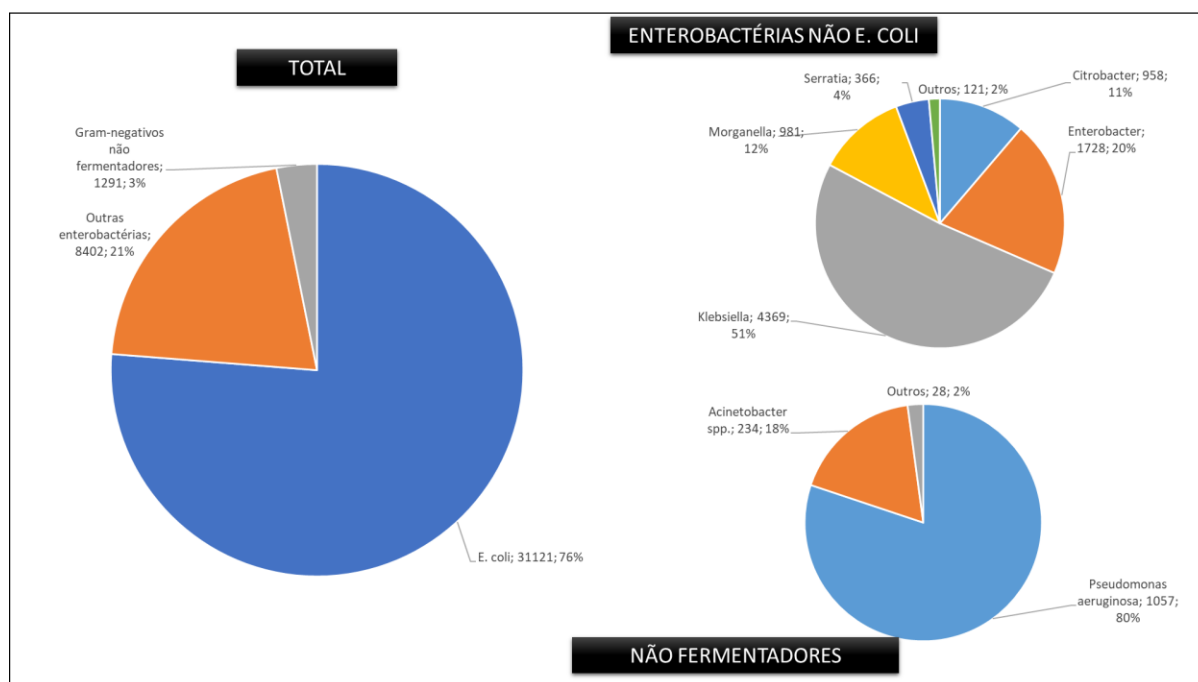


Figura 5. Distribuição dos patógenos identificados no estudo

Quando submetemos a incidência total a Modelo SARIMA, identificamos os parâmetros mostrados na **Tabela 1**. Podemos perceber uma associação com a média móvel de grau 1 para sazonalidade.

Tabela 1. Coeficientes do Modelo SARIMA (1,0,1) (1,0,1)₁₂ para série temporal de incidência geral de infecções do trato urinário iniciadas na comunidade com identificação etiológica.

	Coeficiente	SE	IC95%		p
AR	0,999	0,002	0,995	1,003	<0,001
SAR	0,003	0,045	-0,085	0,090	0,74
MA	0,798	0,046	0,707	0,889	<0,001
SMA	0,565	0,096	0,377	0,753	<0,001

Nota. AR, autorregressão; SAR, autorregressão sazonal; MA, autocorrelação com média móvel incluindo mês anterior; SMA, autocorrelação com média móvel incluindo estação anterior. Os dados apresentados são os coeficientes lineares, com desvio padrão (SE), intervalo de confiança e p-valor. Dados significantes ($p < 0,05$) são apresentados em negrito.

Em uma segunda abordagem de avaliação da sazonalidade, utilizamos modelo de autocorrelação da incidência de cada mês os anteriores (*lag*), como observamos na **Figura 6**

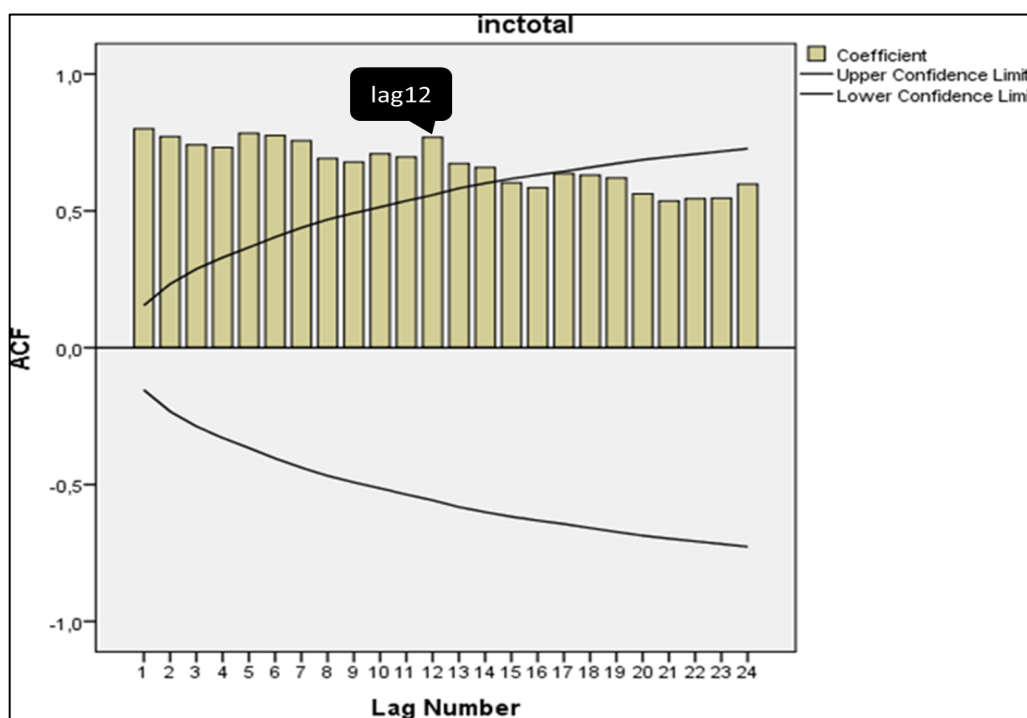


Figura 6. Gráfico de autocorrelação da incidência global de infecção do trato urinário diagnosticada na comunidade com etiologia identificada. Dados fora das linhas curvas representam autocorrelações significantes. Notar aumento discreto no coeficiente de correlação em *lag* 12.

Por fim, em modelo de Regressão de Poisson, ajustado para tendência temporal, pudemos observar a o predomínio das ITUs no verão (**Tabela 1**).

Tabela 2. Modelo de Regressão de Poisson para sazonalidade de uroculturas positivas para patógenos de origem na comunidade.

Fatores	RT	IC95%		p
Vetor temporal (mês)	1,006	1,006	1,006	<0,001
Estação do ano				
<i>Inverno (referência)</i>
<i>Primavera</i>	0,91	0,88	0,93	<0,001
<i>Verão</i>	1,11	1,07	1,14	<0,001
<i>Outono</i>	1,03	1,01	1,06	0,016

Nota. Dados significantes apresentados em negrito. RT, Razão de Taxas; IC, Intervalo de Confiança.

Quando utilizamos modelos de Box-Jenkins nos três grupos relevantes (*E. coli*, outras enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores), percebemos que só a primeira apresenta coeficientes sazonais significantes (**Tabela 3**). Via de regra, apresentam autocorrelação com os valores imediatamente anteriores ou sua média móvel.

Tabela 3. Modelo SARIMA (1,0,1) (1,0,1)₁₂ mostrando coeficientes de autorregressão e sazonalidade para incidência de grupos específicos de uropatógenos.

Agente/Coefficientes	Patógeno	SE	IC95%		p
<i>E. coli</i> total					
AR	0,97	0,02	0,93	1,01	<0,001
SAR	0,79	0,12	0,56	1,02	<0,001
MA	0,69	0,09	0,51	0,87	<0,001
SMA	0,27	0,18	-0,09	0,63	0,121
<i>E. coli</i> ESBL+					
AR	0,99	0,02	0,95864	1,02136	<0,001
SAR	0,33	0,51	-0,6696	1,3296	0,52
MA	0,68	0,08	0,5232	0,8368	<0,001
SMA	0,14	0,53	-0,8988	1,1788	0,78
Outras enterobactérias					
AR	0,99	0,00	0,98902	0,99098	<0,001
SAR	0,0045	0,16	-0,3091	0,3181	0,78
MA	0,75	0,05	0,648472	0,851528	<0,001
SMA	-0,22	0,08	-0,37288	-0,06712	0,004
Não fermentadores					
AR	1,00	0,00	0,99804	1,00196	<0,001
SAR	-0,002	0,01	-0,01376	0,00976	0,64
MA	0,79	0,05	0,69984	0,88016	<0,001
SMA	-0,22	0,10	-0,416	-0,024	0,03

Nota. A significância dos coeficientes de sazonalidade em *E. coli* global, não se repetem em subgrupo produtor de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Resultados significantes são apresentados em negrito.

Por outro lado, diferentes resultados em testes simples de autocorrelação para grupos do estudo são mostrados na **Figura 7**. Podemos sugerir a sazonalidade (correlação crescente em *lag* 12) para todos os patógenos. Já os “picos de verão” na Regressão de Poisson foram observados para *E. coli* e outras enterobactérias, porém não para bacilos Gram-negativos não fermentadores.

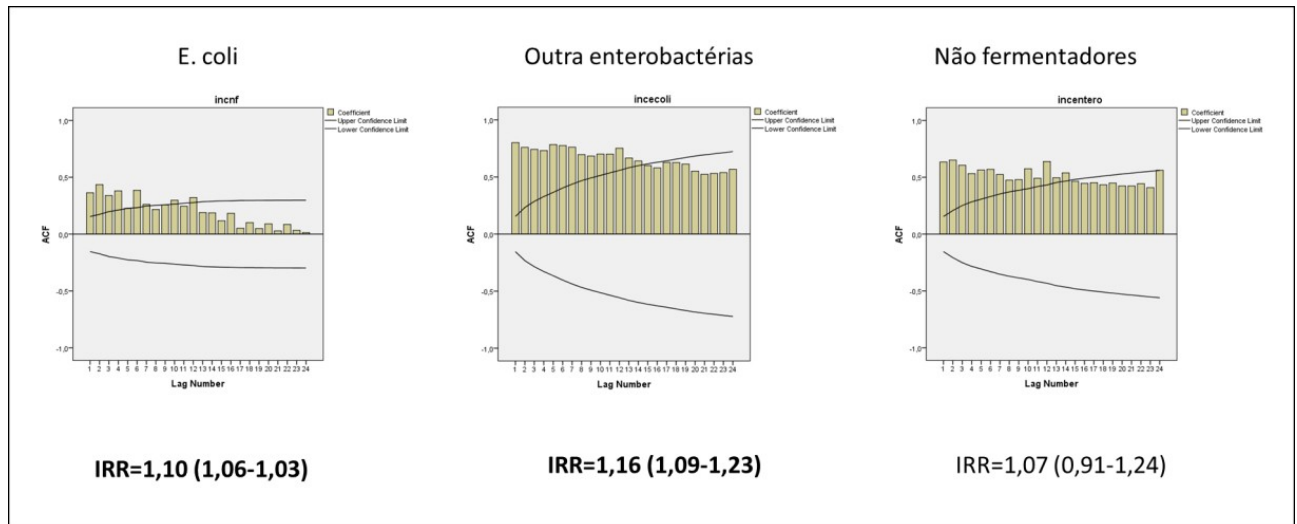


Figura 6. Gráficos de autocorrelação (acima) e resultados de regressão de Poisson para predomínio no verão (abaixo) para incidência de uropatógenos de interesse no período de 2005 a 2018. IRR=Razão de Taxas de Incidência (Intervalo de Confiança 95%) para o verão. Resultados significantes são apresentados em negro.

Alterações em incidência e etiologia das ITU após a RDC 44/2010

Na análise de ITS notamos aumento contínuo da incidência global de patógenos, que a nosso ver pode corresponder a um viés de acesso ao exame microbiológico, que foi provavelmente melhorado ao longo dos anos, além da facilidade ao acesso a saúde e dos profissionais da saúde tomarem consciência maior sobre a necessidade de solicitação de exame de cultura em casos de infecção do trato urinário (**Figura 8**). De fato, em modelo linear, se detectou tanto crescimento contínuo ao longo do tempo (coeficiente= + 0,50; Intervalo de Confiança [IC] 95%=+ 0,26 a +0,74; $p < 0,001$) e na análise pós *versus* pré-RDC 44 (coeficiente=+59,25; IC95%= +38,78 a +79,72). Reconhecemos esse viés de acesso como uma limitação do nosso estudo. Tentamos reduzir seu impacto sobre os resultados das análises posteriores com algumas estratégias: (a) usamos como denominador o número total de amostras; (b) em todas as análises fizemos ajuste para variável de série temporal; (c) acrescentamos análises de ITS com modelos de Poisson, que representam de forma mais acurada a evolução de taxas com denominadores variáveis.

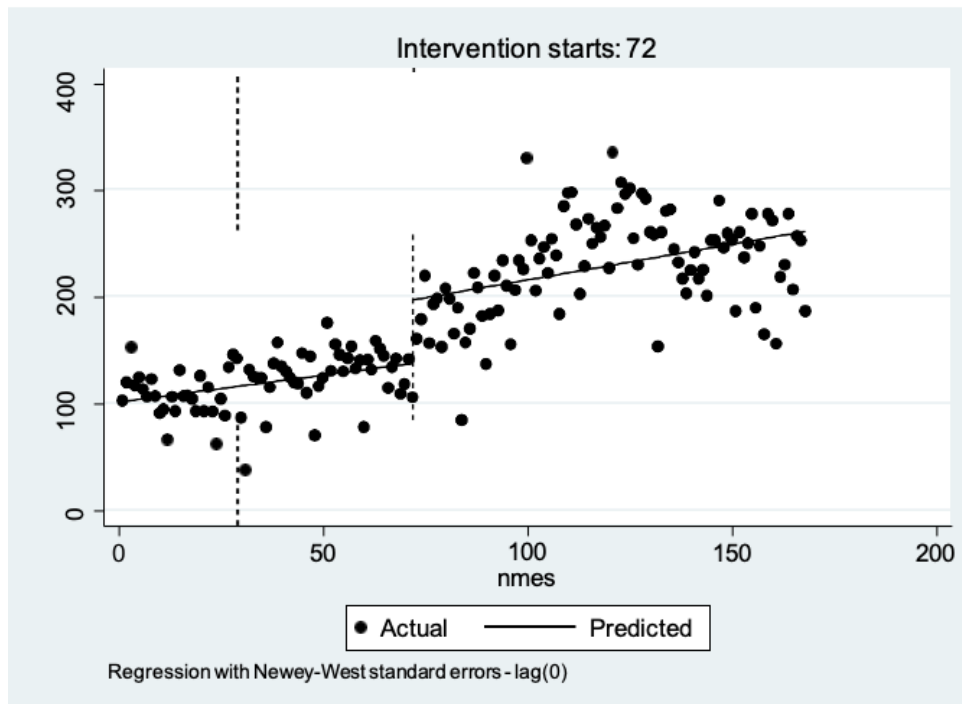


Figura 8. Análise de ITS para incidência populacional global de uropatógenos identificados no laboratório de microbiologia do HCFMB.

Em relação a proporção de bactérias não-*E. coli*, notamos redução contínua tanto para Enterobactérias (coeficiente=-0,001; IC95%=-0,001 a -0,0002; p=0,009) quanto para não fermentadores (coeficiente=-0,0004; IC95%=-0,0007 a -0,0002; p<0,001), **porém sem impacto da intervenção (RDC 44)**, como mostrado nas Figuras 9 e 10.

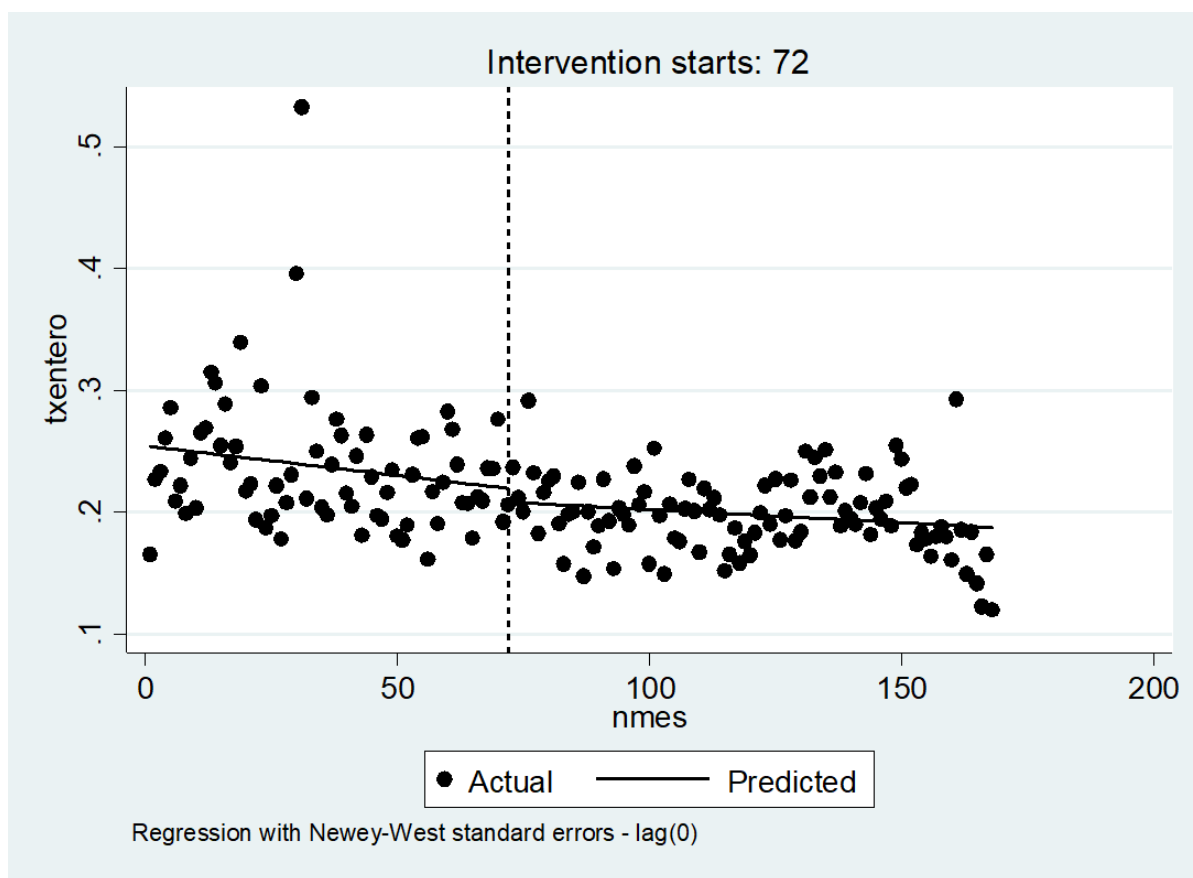


Figura 9. Análise de ITS para proporção de identificação de enterobactérias não-E. coli no período de 2005 a 2018.

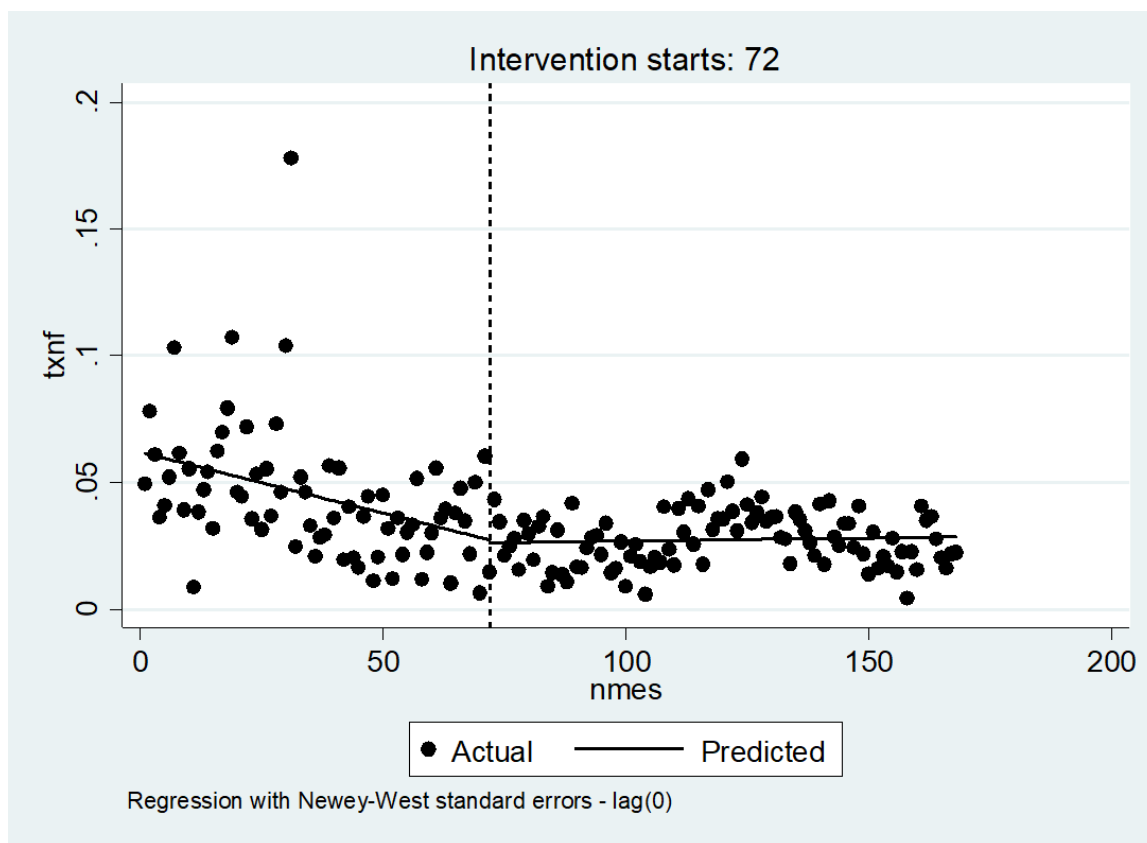


Figura 10. Análise de ITS para proporção de identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores no período de 2005 a 2018.

Não encontramos explicação para esse resultado, porém é possível que o maior acesso aos exames microbiológicos tenha levado à análise de casos menos complicados de infecção do trato urinário, e, portanto, ao aumento proporcional de *E. coli*. Essa tendência, porém, não se reflete nas séries temporais de resistência, como veremos adiante.

Finalizando esta sessão, deve-se enfatizar sazonalidade de ITU tem sido reportada. Estudo realizado na Turquia identificou que 35,3% das infecções ocorreram no verão, contra 10,7% no inverno.⁵⁰

Alterações na resistência microbiana de uropatógenos após a RDC 44/2010

Escherichia coli

Para robustez da análise de *E. coli*, somente incluímos antimicrobianos para os quais pelo menos 50 isolados foram testados todos os meses. Os antimicrobianos de uso exclusivo por via endovenosa e/ou intramuscular, que não são vendidos e aplicados em farmácias, foram utilizados como controle, como forma de avaliação das alterações do tempo em resistência antimicrobiana, independente do efeito da RDC 44. Os resultados são apresentados abaixo.

Resistência à amicacina

Não foi detetada sazonalidade em modelos de autocorrelação ou regressão de Poisson para estações (**Figura 11**). Na análise de ITS por modelos lineares (**Tabela 4**) e de Poisson (**Tabela 5**) observou-se redução da resistência após intervenção (RDC 44).

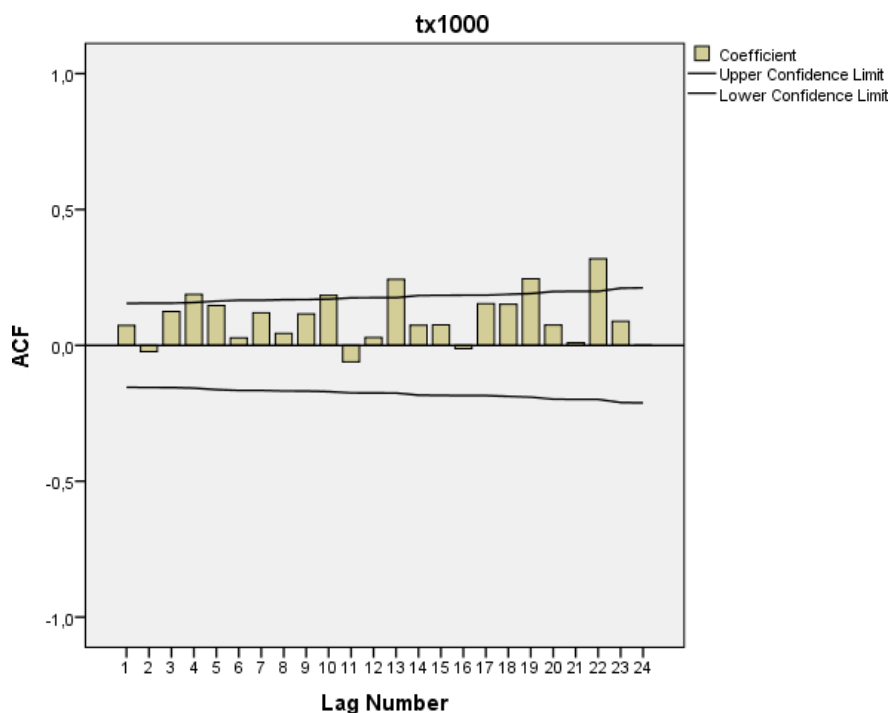


Figura 11. Gráfico de autocorrelação de taxas de resistência de *E. coli* à amicacina.

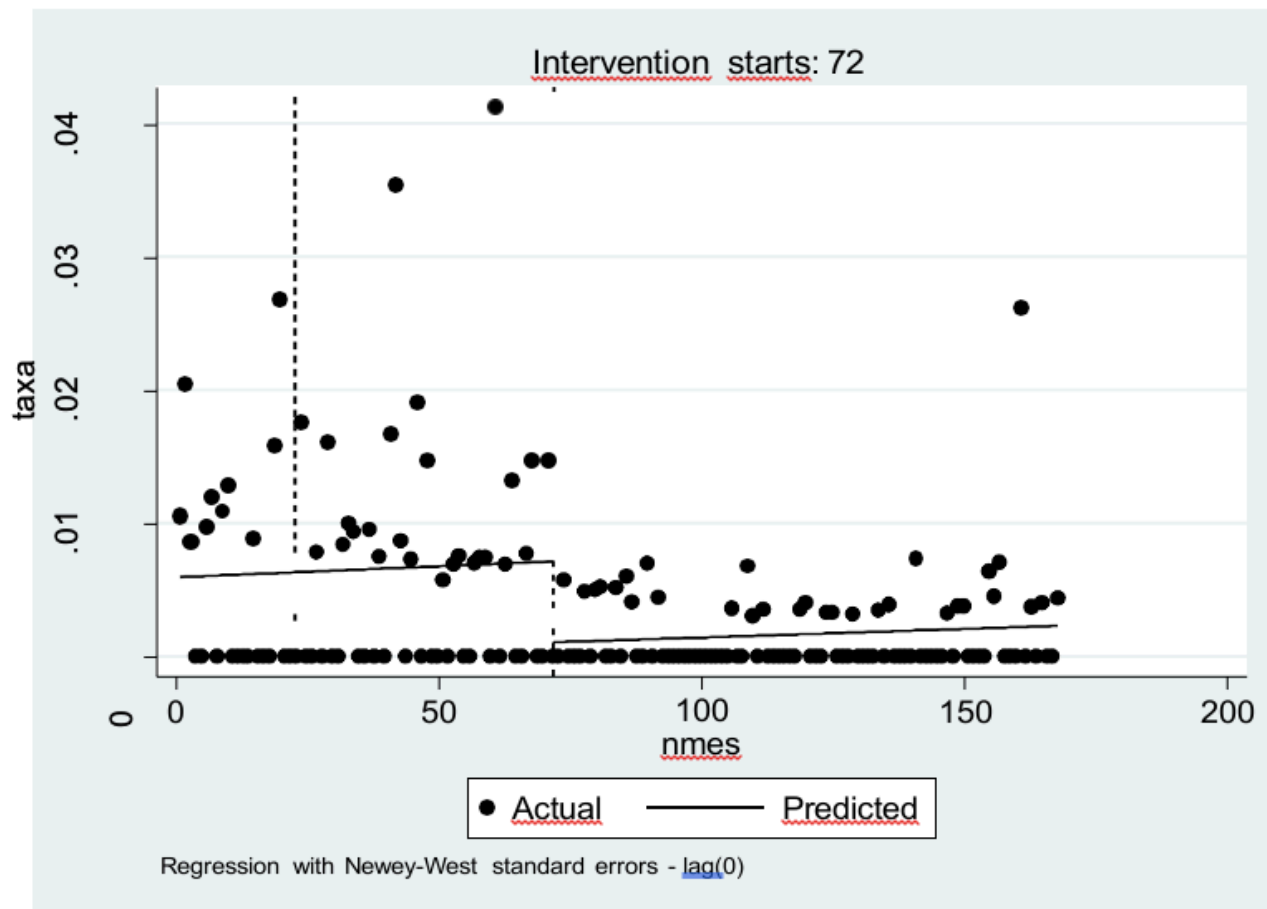


Figura 12. Análise de ITS para resistência de *E. coli* à Amicacina.

Tabela 4. Modelo linear de ITS para resistência de *E. coli* à Amicacina.

Fatores	Coefficiente	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	1,65	0,76	-8,00	1,11
Intervenção	-60,82	0,009	-106,23	-15,41
Alteração de tendência	-3,53e-06	0,46	-105,00	98,00

Tabela 5. Modelo de regressão de Poisson em ITS para resistência de *E. coli* à Amicacina.

Fatores	Razão de taxas	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	1,002	0,69	0,99	1,016
Intervenção	0,438	0,001	0,583	0,718
Alteração de tendência	1,003	482	0,886	1,024

Resistência à Cefalotina

De forma semelhante, não houve sazonalidade para Cefalotina em modelos de autocorrelação (**Figura 13**), apesar de leve aumento no outono (IRR= 1,05; IC95=1,004 -1,10; $p=0,04$).

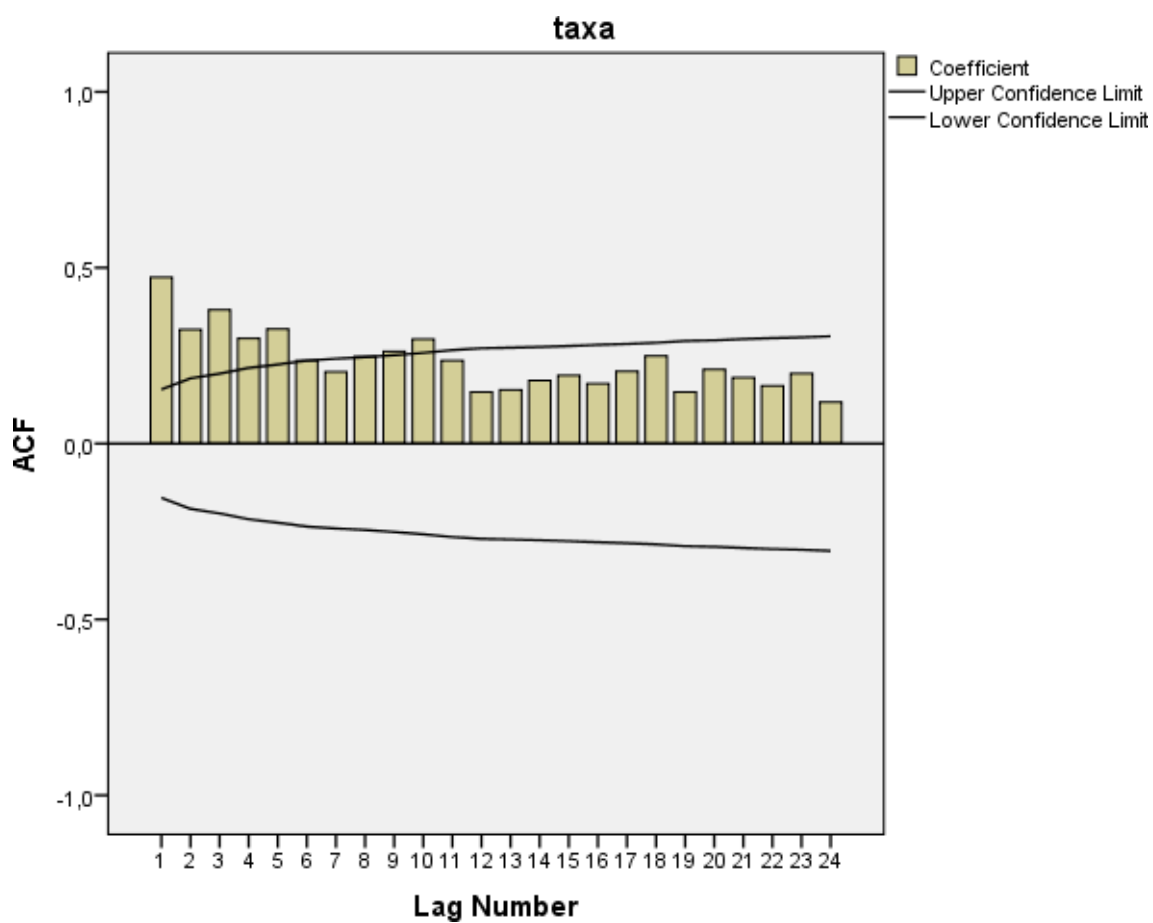


Figura 13. Teste de autocorrelação parcial para resistência de *E. coli* à cefalotina.

Os coeficientes dos modelos de regressão são apresentados nas **Tabelas 6 e 7** e **Figura 14**.

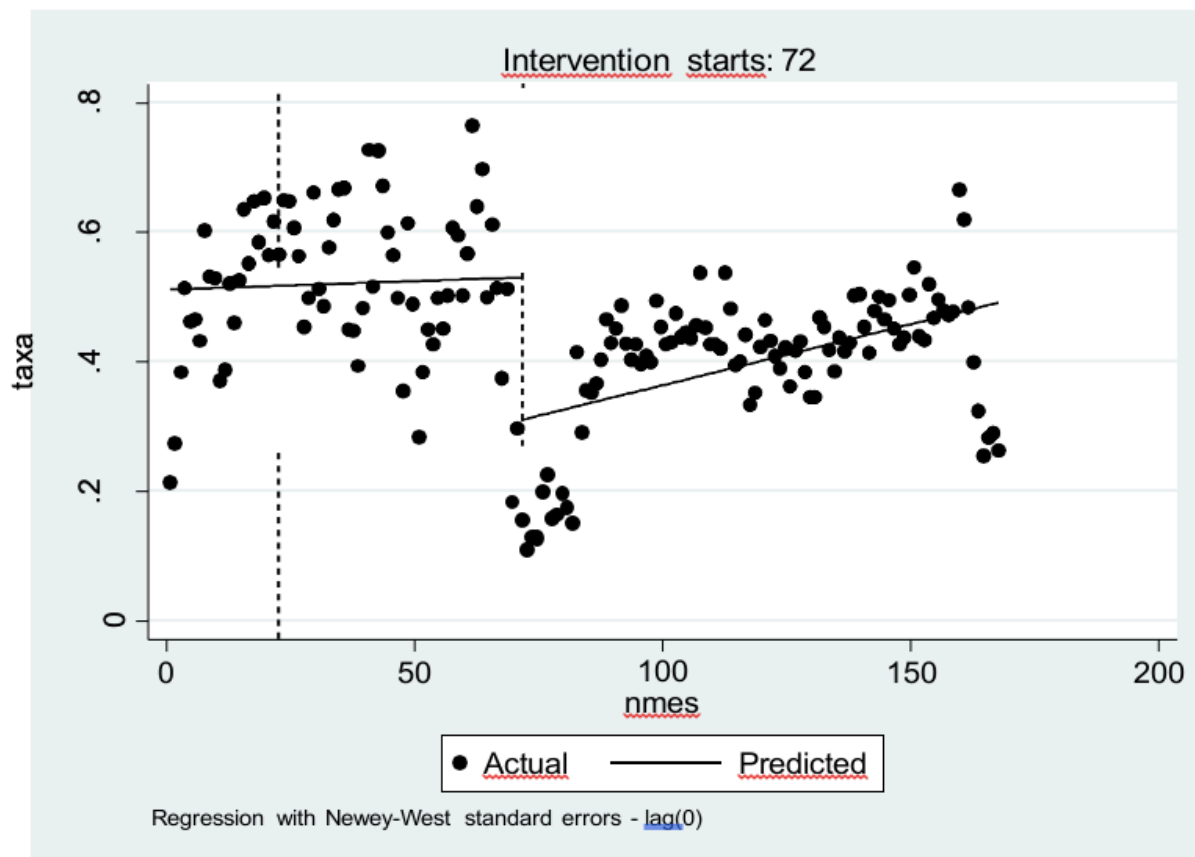


Figura 14. Análise de ITS para resistência de *E. coli* à Cefalotina.

Tabela 6. Modelo linear de ITS de resistência de *E. coli* à Cefalotina.

Fatores	Coef.	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	0,0003	0,76	-0,00140	0,00192
Intervenção	-0,222	<0,001	-0,305	-0,134
Alteração de tendência	,0016	0,09	-,0002	,0035

Tabela 7. Modelo de regressão de Poisson de ITS de resistência de *E. coli* à cefalotina.

Fatores	RT	p	IC95%	
Série temporal (mês)	1,000	0,40	0,991	1,002
Intervenção	0,181	<0,001	0,188	0,437
Alteração de tendência	1,003	0,32	0,985	1,021

Resistência ao Ceftriaxone

Não houve sazonalidade detectada em autocorrelação (**Figura 15**) ou em modelos multivariados de Poisson. O impacto da intervenção (RDC44) foi nulo (modelo linear; **Figura 16** e **Tabela 8**), embora tenha persistido tendência geral de crescimento das taxas de resistência (Regressão de Poisson; **Tabela 9**).

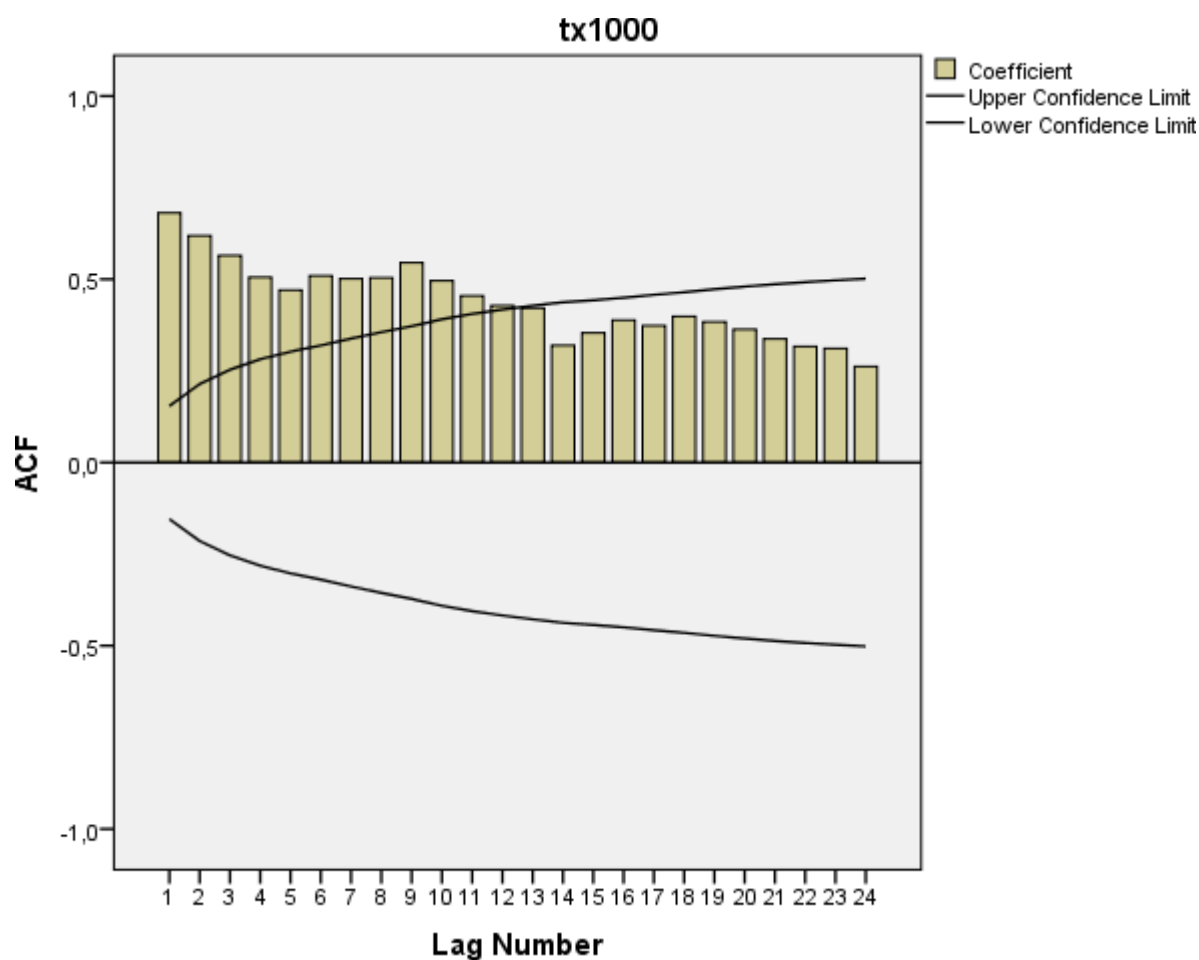


Figura 15. Gráfico de autocorrelação parcial para resistência de *E. coli* à ceftriaxone

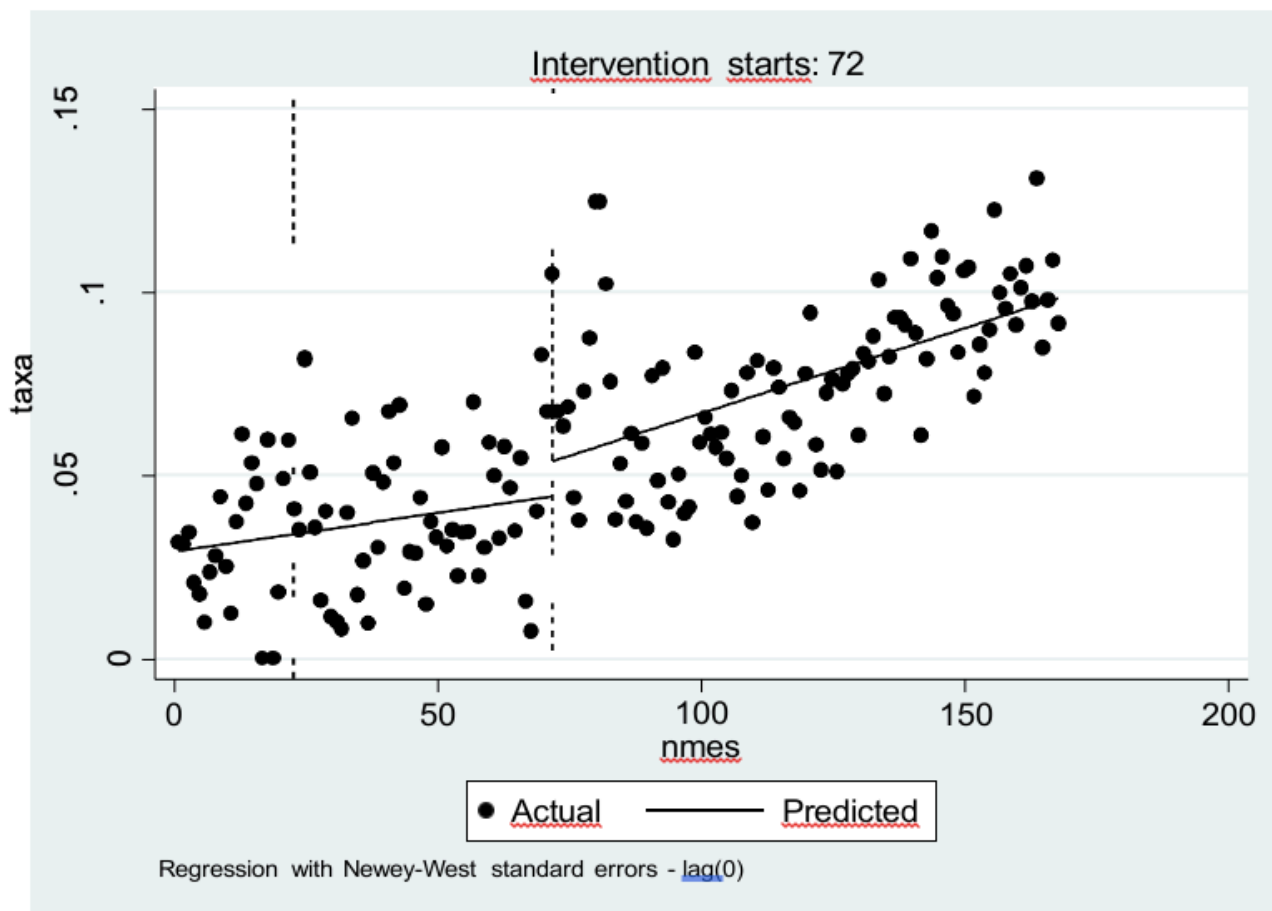


Figura 16. Gráfico de ITS da resistência de *E. coli* à ceftriaxone.

Tabela 8. Modelo linear de ITS de resistência de *E. coli* à ceftriaxone.

Fatores	Coef.	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	0,0003735	0,15	0,0001348	0,00088
Intervenção	0,0247	0,17	-0,0101	0,0586
Alteração de tendência	0,0002	0,53	-0,0004	0,0008

Tabela 9. Modelo de Regressão de Poisson de ITS para resistência de *E. coli* à Ceftriaxona.

Fatores	Razão de taxas	p	[95% Conf. Interval]	
Série temporal (mês)	1.006	0,048	1.00006	1.01166
Intervenção	1.20	0,129	0,95	1.53
Alteração de tendência	1,00	0,789	0,99	1,01

Resistência ao Ciprofloxacino

Houve predomínio de isolados resistentes a ciprofloxacino no verão (**Tabela 10**), embora não se tenha detetado sazonalidade clara nos gráficos de autocorrelação (**Figura 17**).

Tabela 10. Modelo de regressão de Poisson para sazonalidade de resistência de *E. coli* ao Ciprofloxacino.

Fatores	Razão de taxas	p	IC 95%	
Estação referência (inverno)				
Primavera	0,933	0,039	0,86	0,99
Verão	1,08	0,014	1,02	1,14
Outono	0,97	0,294	0,91	1,03
Variável de série temporal	1,003	>0,001	1,002	1,004

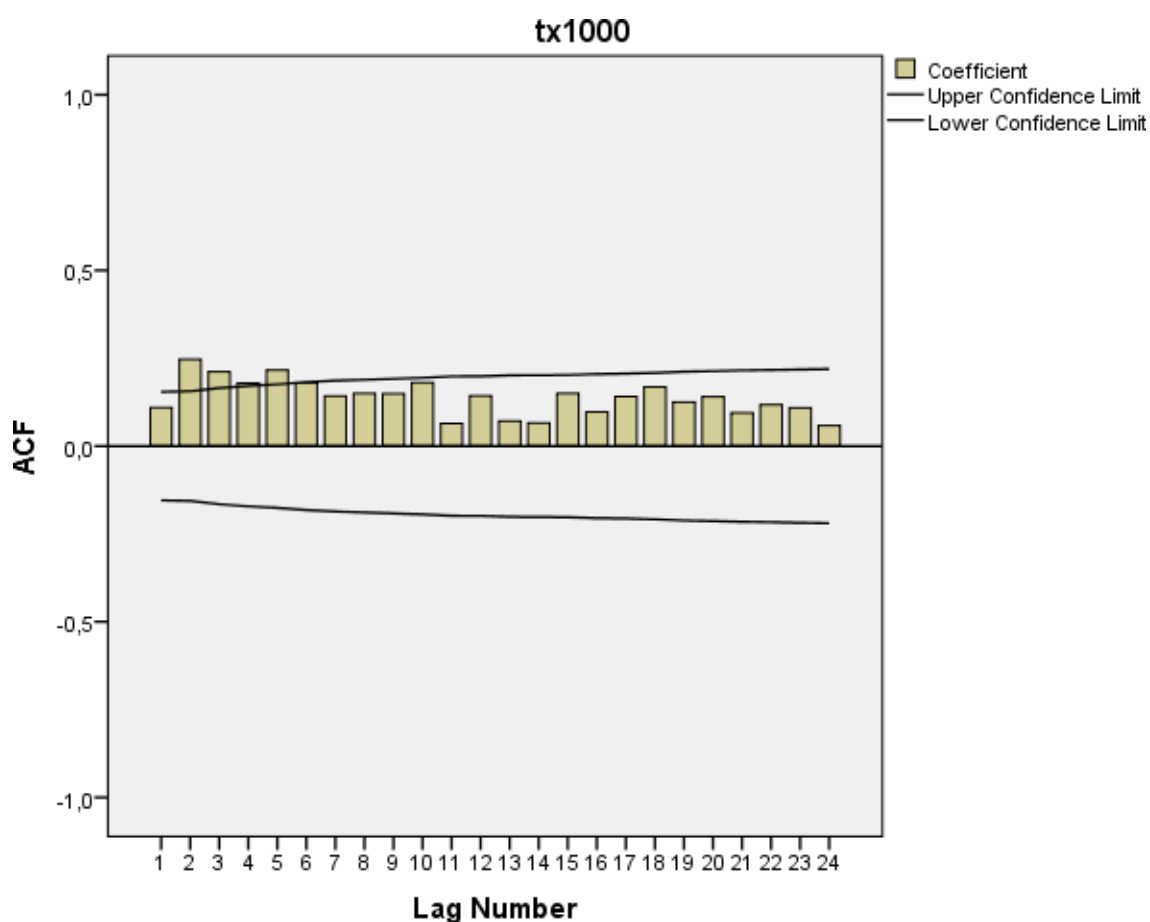


Figura 17. Gráfico de autocorrelação da resistência de *E. coli* ao Ciprofloxacino.

Quanto à influência da intervenção (RCD44), esta foi praticamente nula (**Figura 18**, **Tabelas 11 e 12**). A taxa de resistência cresceu de forma regular ao longo do período do estudo (2005-2018). Esse dado é relevante, uma vez que quinolonas têm sido amplamente utilizadas para o tratamento de ITU adquiridas na comunidade em nosso país.⁴⁹

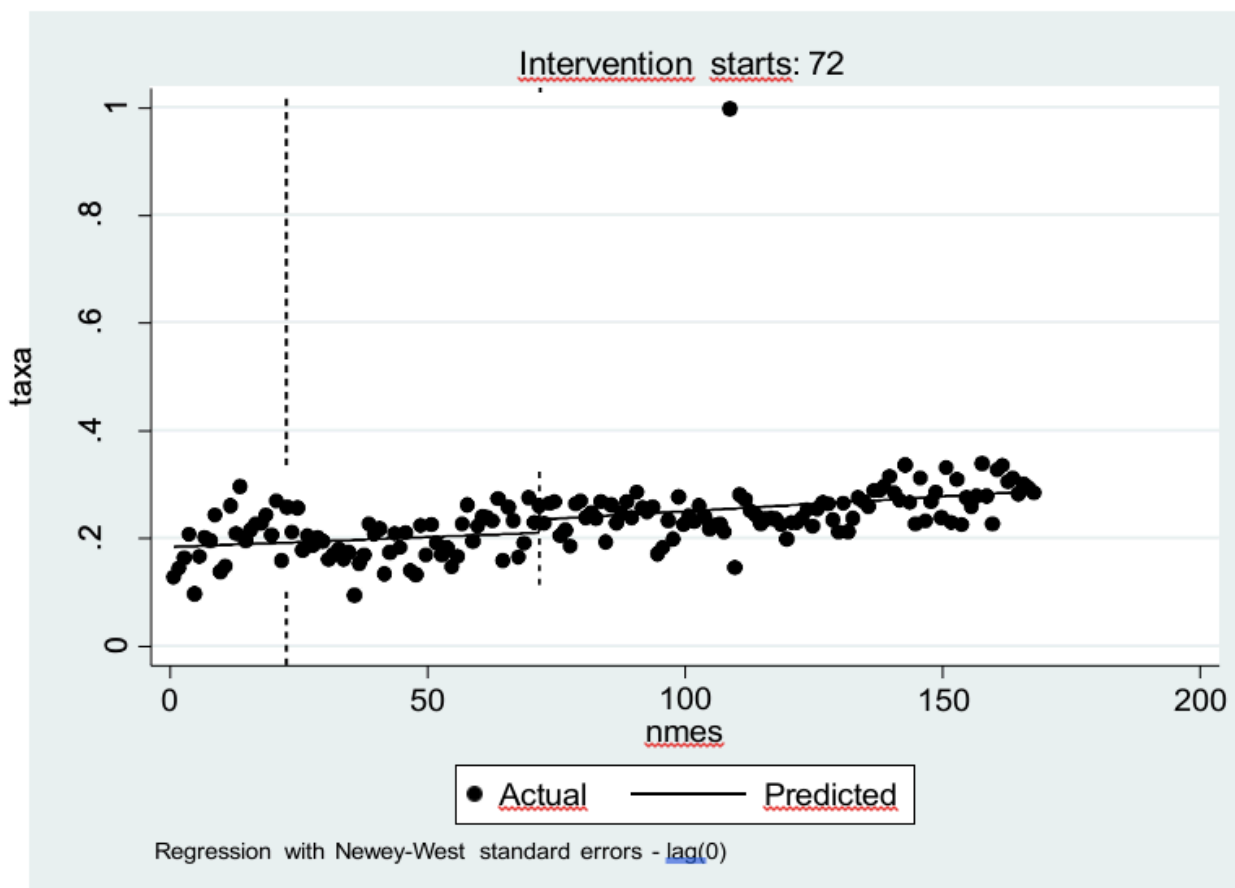


Figura 18. Gráfico de análise de ITS para resistência de *E. coli* ao Ciprofloxacino.

Tabela 11. Modelo linear de ITS para resistência de *E. coli* ao Ciprofloxacino.

Fatores	Coeficiente	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	0,003735	0,15	-0,0001348	0,0008818
Intervenção	0,0242753	0,17	-0,010113	0,0586635
Alteração de Tendência	0,0001746	0,56	-0,0004207	0,0007699

Tabela 12. Modelo de Regressão de Poisson para ITS de resistência de *E. coli* ao Ciprofloxacino.

Fatores	Razão de taxas	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	1,0025	0,044	1,000065	1,005046
Intervenção	1,116598	0,049	1,000533	1,246126
Alteração de tendência	0,9993197	0,616	0,9966677	1,001979

Resistência a Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX)

Não se detetou sazonalidade na resistência ao TMP nos testes de autocorrelação (**Figura 19**) nem em modelos de regressão de Poisson. A tendência temporal foi de redução, com estabilização após a intervenção (RDC 44), conforme evidenciado na **Figura 19** e nas **Tabelas 13** e **14**. De fato, o coeficiente da interação entre intervenção e tempo é significativo, porém sinalizando mudança de tendência de queda da resistência para estabilidade.

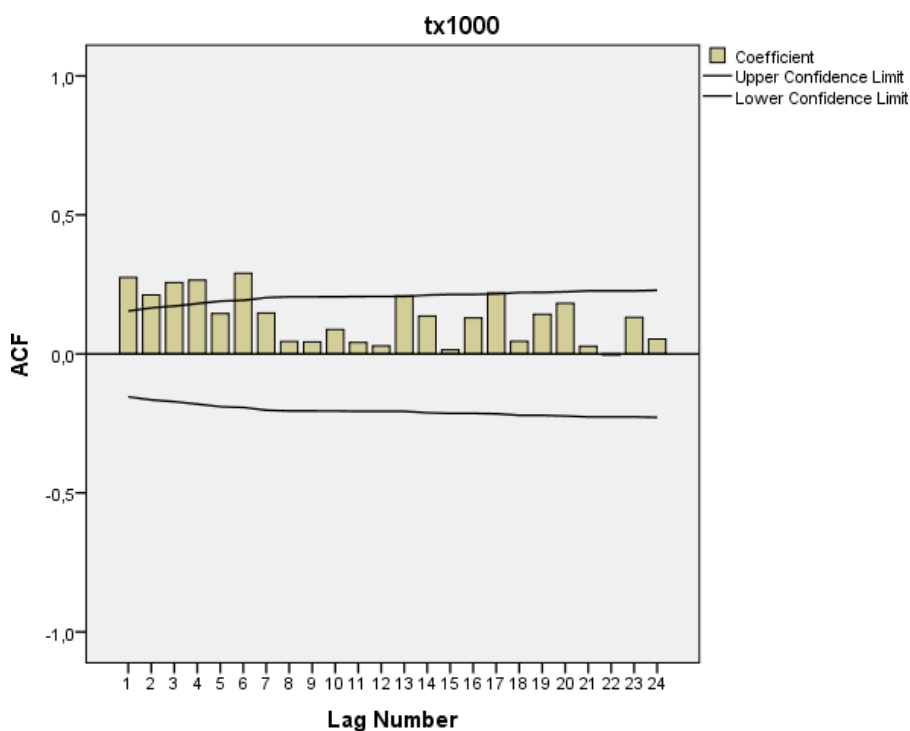


Figura 19. Gráfico de autocorrelação da resistência de *E. coli* a TMP/SMX.

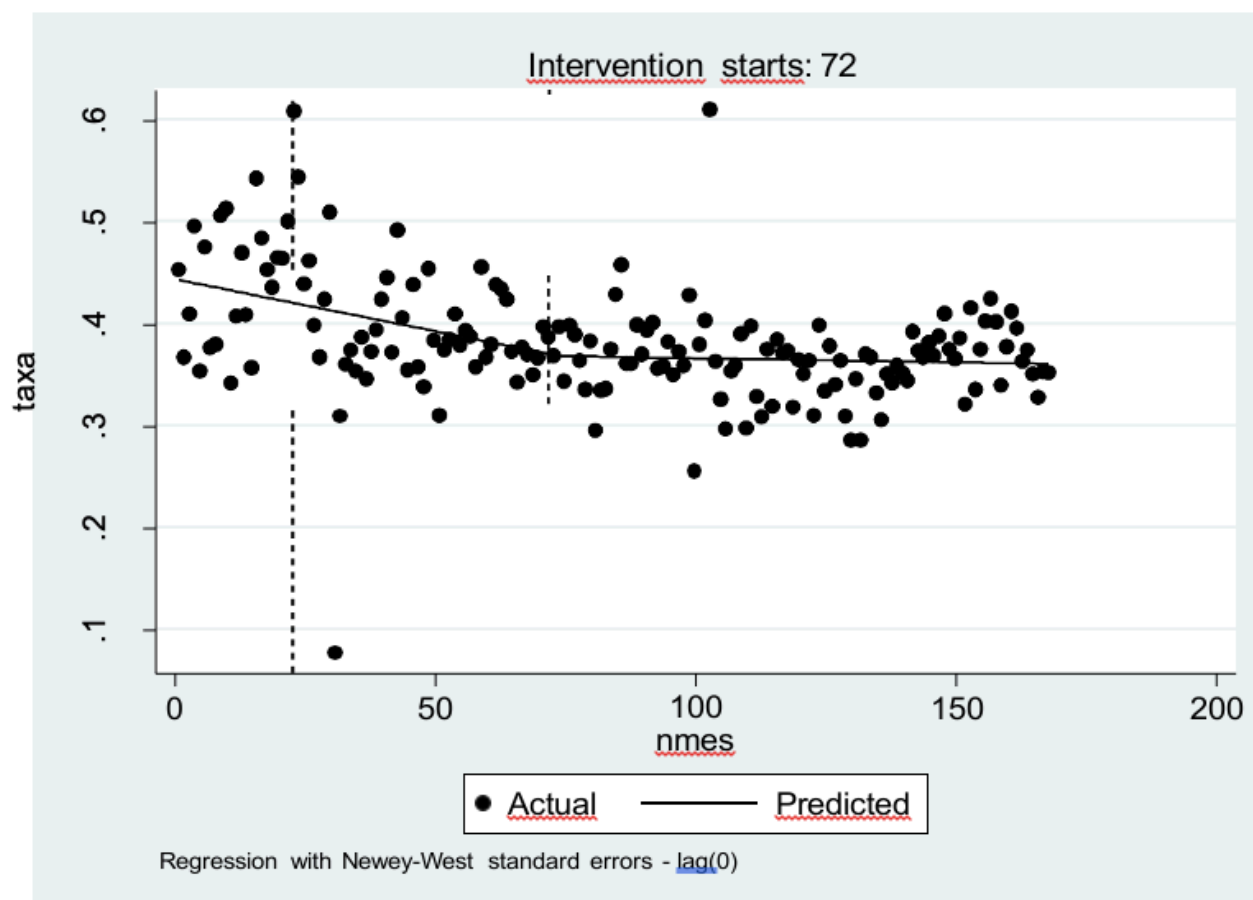


Figura 19. Gráfico de ITS de resistência de *E. coli* a TMP/SMX.

Tabela 13. Modelo linear de ITS de resistência de *E. coli* a TMP/SMX.

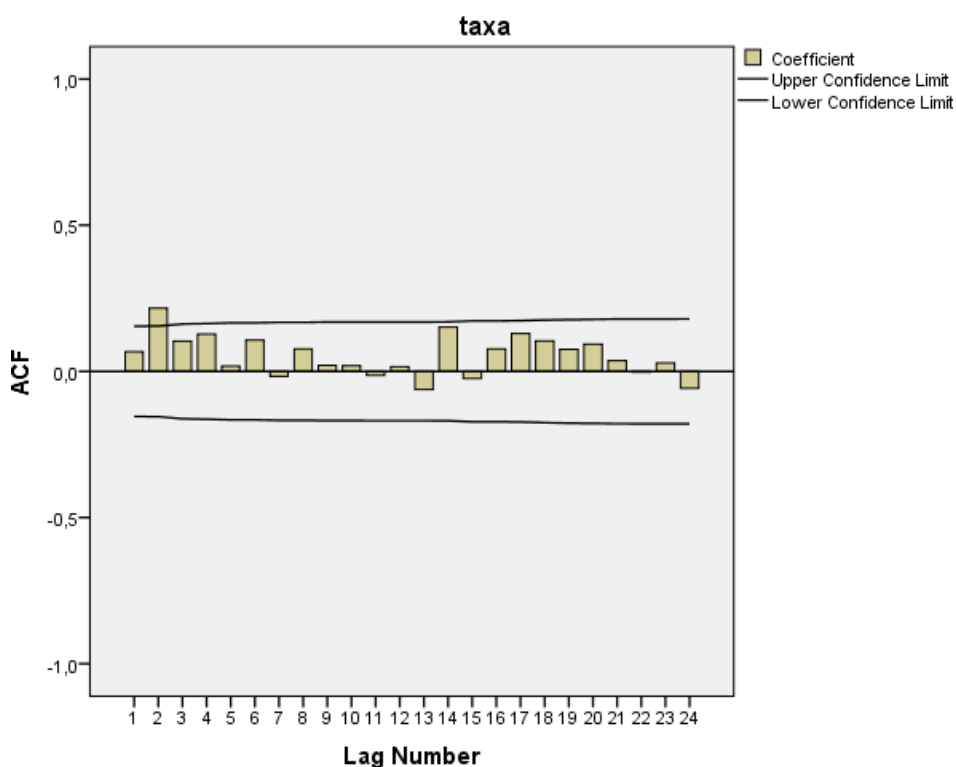
Fatores	Coefficiente	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	-0,0010153	0,001	-0,0016042	-0,0004264
Intervenção	-0,002111	0,87	-0,028005	0,023783
Alteração de tendência	0,0009367	0,005	0,0002937	0,0015796

Tabela 12. Modelo de Regressão de Poisson de ITS de resistência de *E. coli* a TMP/SMX.

Fatores	Razão de taxas	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	0,997715	0,009	0,9960079	0,999425
Intervenção	0,9715002	0,49	0,8947646	1,054817
Alteração de tendência	1,002182	0,02	1,000292	1,004076

Enterobactérias não *E. coli*

Para estas, o antimicrobiano mais consistentemente testado foi a ceftriaxone. Neste caso, não foi observada sazonalidade (**Figura 20**) nem “picos de verão” no modelo de Poisson. Já na análise de ITS obtivemos padrão em “V”, com importante mudança de tendência, no sentido de aumento da resistência, após a RDC44 (**Figura 21 e Tabelas 13 e 14**).

**Figura 20.** Autocorrelação de resistência à ceftriaxone em enterobactérias não-*E. coli*.

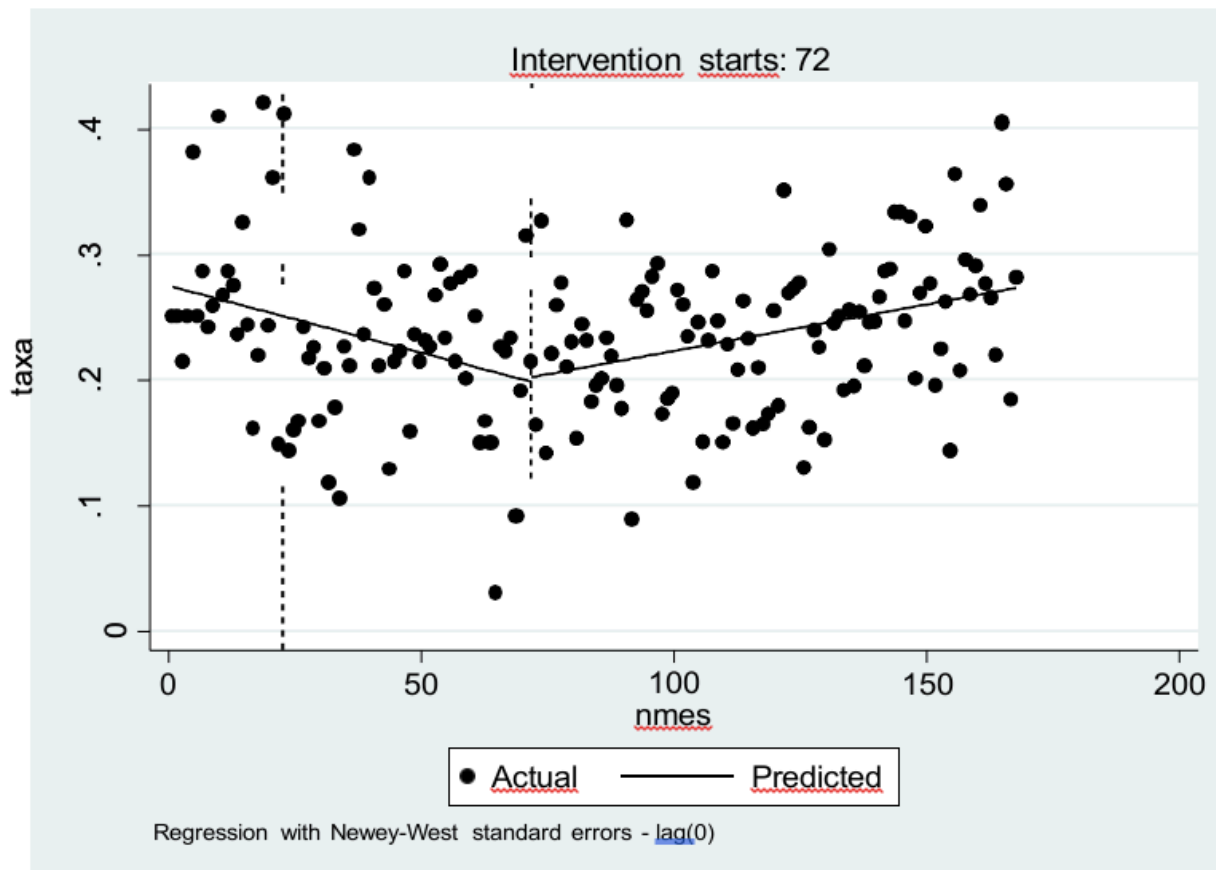


Figura 21. Análise de ITS para resistência de enterobactérias não-*E. coli* à ceftriaxone.

Tabela 13. Modelo linear de ITS para resistência de enterobactérias não-*E. coli* à ceftriaxone.

Fatores	Coefficiente	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	-0,0004796	>0,001	-0,0007086	-0,0002505
Intervenção	-0,0011249	0,82	-0,0106035	0,0083538
Alteração de Tendência	0,000503	>0,001	0,0002631	0,000743

Tabela 14. Modelo de Regressão de Poisson de ITS para resistência de enterobactérias não *E. coli* à ceftriaxone.

Fatores	Razão de Taxas	p	IC95%	
Série temporal (mês)	0,9979777	0,04	0,9960536	0,9999055
Intervenção	0,9614502	0,42	0,8745328	1,057006
Alteração de Tendência	1,000985	0,37	0,9988323	1,003141

Bacilos Gram-Negativos Não Fermentadores (NF)

No caso dos NF, foram analisadas as resistências à ceftazidima e ao imipenem. Em ambos os casos, não houve sazonalidade identificada em autocorrelação nem em modelos de regressão de Poisson.

As **Figuras 22 e 23** apresentam a ITS do impacto da RDC44 sobre as taxas de resistência.

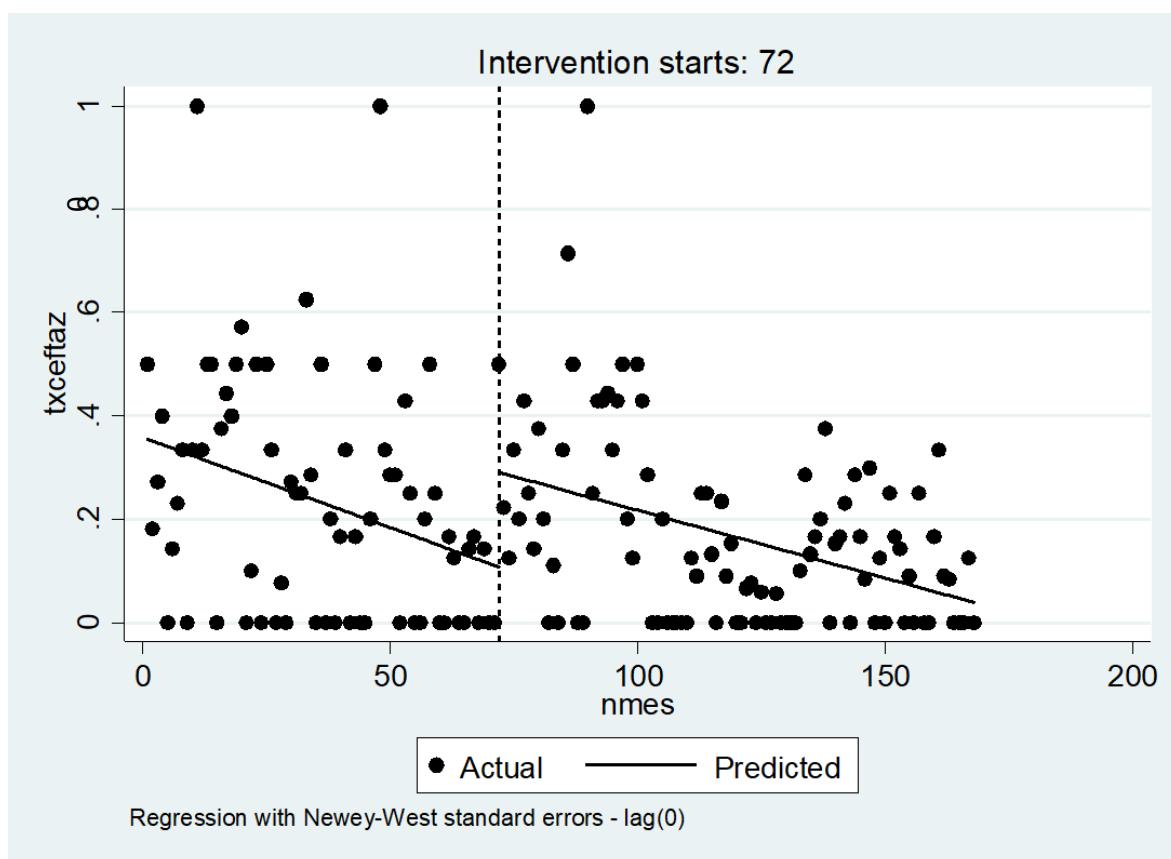


Figura 22. Análise de ITS para resistência de NF à Cefotazidima.

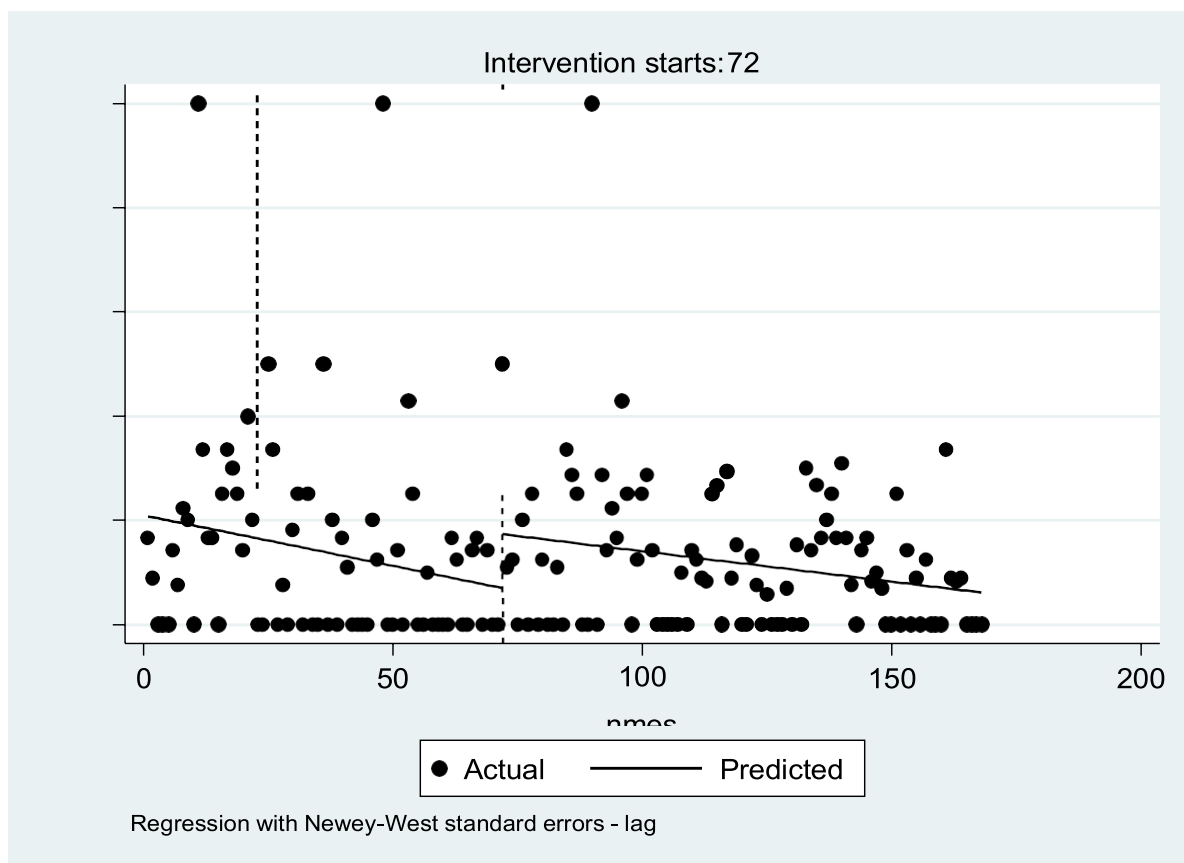


Figura 23. Análise de ITS para resistência de NF ao Imipenem.

As análises são apresentadas também nas **Tabelas 15 a 18**.

Tabela 15. Modelo linear de ITS para resistência de NF à Ceftazidima.

Fatores	Coeficiente	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	-0,0034808	0,003	-0,0057192	-0,0012425
Intervenção	0,1832498	0,003	0,0651069	0,3013928
Alteração de tendência	0,0008623	0,51	-0,0016843	0,0034089

Tabela 16. Modelo de regressão de Poisson para resistência de bacilos Gram-negativos não fermentadores à ceftazidima.

Fatores	Razão de taxas	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	0,9856886	0,004	0,975976	0,9955166
Intervenção	2,291439	0,006	1,264562	4,152182
Alteração de tendência	0,999096	0,885	0,9869338	1,011408

Tabela 17. Modelo linear de ITS para resistência de NF ao imipenem.

Fatores	Coefficiente	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	-0,0019206	0,06	-0,0039558	0,0001147
Intervenção	0,1021424	0,06	-0,0032934	0,2075782
Alteração de tendência	0,0007675	0,51	-0,001546	0,0030811

Tabela 18. Modelo de regressão de Poisson para ITS para resistência de NF ao imipenem.

Fatores	Razão de taxas	p	IC 95%	
Série temporal (mês)	0,9899462	0,127	0,9771684	1,002891
Intervenção	1,763762	0,138	0,8335784	3,732015
Alteração de Tendência	1,004328	0,579	0,9891057	1,019786

Considerações sobre a associação entre uso de antimicrobianos e resistência em infecções da comunidade

A complexidade dos determinantes da emergência e disseminação da resistência microbiana não é facilmente abordada em estudos epidemiológicos.⁴² Em ambientes “fechados”, como hospitais^{71,72}, casas de repouso⁷³ e instituições prisionais⁷⁴, alguns fatores relevantes na cadeia causal são mais facilmente identificáveis. Em grupos populacionais amplos, ou grandes coortes abertas (o que chamamos de “comunidade”), as relações de causalidade são menos tangíveis.^{75,76}

Entre os diversos aspectos que tem sido implicados nesse fenômeno, a interface humanos-animais-ambiente (popularmente denominada “saúde única”, ou “one health”)⁷⁷, a seleção por vacinas⁷⁸, em conjunto com fatores alimentares e estilo de vida, tem sido

implicados em alterações do microbioma⁷⁹, que se torna um reservatório permanente potenciais patógenos.

Nessa constelação, o uso de antimicrobianos adquiridos em farmácia representa, quando muito, um ponto isolado, de significância ainda indeterminada. Nosso estudo se inclui entre outros que buscam identificar a associação entre a restrição desse uso e os perfis de resistência em patógenos da comunidade. Nossos achados apontaram para impacto frágil – se existente – da RDC 44/2010 sobre a resistência em uropatógenos.

Avaliamos a intervenção da RDC 44 em venda de antimicrobianos com receita médica, porém, o estudo foi realizado com culturas de pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), no qual a distribuição de medicamentos é realizada com receita médica independente da RDC. Além deste fator, a existência de legislação não significa que seja aplicada, sendo possível encontrar venda de antimicrobianos sem receita em farmácias, porém sem possibilidade de quantificar o quanto das receitas prescritas se enquadram neste perfil.

Nosso estudo é limitado por sua abrangência temporal e espacial, além de possíveis vieses apontados na descrição da metodologia. No entanto, tentamos compensar tais limitações com análises temporais exaustivas. Ao mesmo tempo, abordamos o aspecto sazonal das ITU, corroborando achados prévios de seu predomínio em períodos quentes.

Um achado coerente com o nosso foi relatado em robusto estudo de Moura et al.⁸¹ Abordando a ação da normativa sobre incidência de *E. coli* produtora de ESBL e de *Streptococcus pneumoniae* com múltiplos padrões de resistência, os autores identificaram um crescimento compensatório da utilização de certos antimicrobianos, que se associou ao aumento de resistência.

Concordamos com os achados de Moura et al, ao sugerirem que ações multifacetadas são necessárias para um melhor controle da resistência microbiana em situação “comunitária”. Ao mesmo tempo, acreditamos que a RDC 44/2010 representou um avanço, e que outros critérios de boas práticas – incluindo prescrição de antimicrobianos apropriados e somente na presença de infecções – podem ter sido estimulados por essa normativa. Esse é um caminho aberto para estudos futuros.

Conclusão

- A restrição da venda de antimicrobianos sem receita médica não foi associada a modificações relevantes da etiologia das infecções do trato urinário identificadas na comunidade.
- Nos casos de infecção por *Escherichia coli*, notou-se redução imediata na resistência a cefalosporinas de primeira geração e amicacina, porém não de outros antimicrobianos de uso frequente, como o ciprofloxacino, ou de uso em terapia parenteral ambulatorial, como a ceftriaxona.
- Para o mesmo agente, atenuou-se (embora se tenha mantido) a tendência de redução da resistência a trimetoprim-sulfametoxazol.
- Enterobactérias não *E. coli* não apresentaram alteração na tendência à resistência microbiana após a restrição.
- Também para os bacilos Gram-negativos não fermentadores, não se identificaram alterações de tendência de resistência aos antimicrobianos de interesse.
- Como achado secundário, identificamos sazonalidade e picos de verão para infecção do trato urinário causada por *E. coli* (inclusive isolados produtores de carbapenemase) e outras enterobactérias.

Referências

1. M. Grabe, R. Bartoletti, T.E. Bjerklund Johansen, T. Cai M. Çek, B. EAU Guidelines on Urological Infections 2019. Disponível em: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Urological-infections-2019.pdf>
2. Achi, Antoine. An introduction to botanical medicines: history, science, uses, and dangers. Westport, Conn.: Praeger Publishers. 2018, p. 126. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=HMzxKua4_rcC&pg=PA126&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
3. Kass EH, Finland M. Asymptomatic infection of the urinary tract. *Trans Assoc Am Phys* 1956; 69:56-64.
4. Kass EH. Bacteriuria and pyelonephritis of pregnancy. *Arch Intern Med* 1960. 105: 194-8.
5. Kang CI, Kim J, Park DW, et al. Clinical Practice Guidelines for the Antibiotic Treatment of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infect Chemother*. 2018;50:67-100.
6. Giesen LG, Cousins G, Dimitrov BD, et al. Predicting acute uncomplicated urinary tract infection in women: a systematic review of the diagnostic accuracy of symptoms and signs. *BMC Fam Pract*. 2010; 11:78-92.
7. Rao MVR, Ponnusamy K, Bala S, et al. Urinary Tract Infection (UTI) Still a Force to be Reckoned with. *J Biomed Engin Med Imag*. 2018; 5:23.
8. Chenoweth CE. Urinary Tract Infections: 2021 Update. *Infect Dis Clin North Am*. 2021;35:857-870.
9. Magistro G, Stief CG. The Urinary Tract Microbiome: The Answer to All Our Open Questions? *Eur Urol Focus*. 2019;5:36-38.
10. Neugent ML, Hulyalkar NV, Nguyen VH, Zimmer PE, De Nisco NJ. Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *mBio*. 2020;11(2):e00218-20.
11. Dixon M, Stefil M, McDonald M, et al. Metagenomics in diagnosis and improved targeted treatment of UTI. *World J Urol*. 2020;38:35-43.
12. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:509-515.
13. Kang CI, Kim J, Park DW, et al. Clinical Practice Guidelines for the Antibiotic Treatment of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infect Chemother*. 2018;50:67-100.
14. Cho YS, Chung JM. Antimicrobial Resistance and urinary tract infections: biggest threats. *Urogenit Tract Infect*. 2017; 12(1):12.
15. Brasil. Portaria 2.616 de 12 de maio de 1998. Available from: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html
16. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *J Invest Surg*. 2012;25:67-77.

17. Barreto ML, Teixeira MG, Bastos FI, Ximenes RA, Barata RB, Rodrigues LC. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. *Lancet*. 2011;377:1877-8
18. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB et al. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1-12.
19. Boucher HW. Bad bugs, No drugs 2002-2020: progress, challenges, and call to action. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2020;131:65-71.
20. Song JH. Advances in pneumococcal antibiotic resistance. *Expert Rev Respir Med*. 2013;7:491-8.
21. Kirkcaldy RD, Zaidi A, Hook EW 3rd, et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance among men who have sex with men and men who have sex exclusively with women: the Gonococcal Isolate Surveillance Project, 2005- 2010. *Ann Intern Med*. 2013;158:321-8.
22. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community- associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol*. 2012;15:588-95.
23. Pires FV, da Cunha Mde L, Abraão LM, Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CM. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A Population-Based Survey. *PLoS One*. 2014;9:e92537.
24. Warren RE, Harvey G, Carr R, Ward D, Doroshenko A. Control of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:124-33.
25. Pitout JD. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10:1165-76.
26. Auta A, Hadi MA, Oga E, et al. Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: a systematic review and meta-analysis. *J Infect* 78:8-18.
27. Andrade SS, Sader HS, Jones RN, et al. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:741-8.
28. Rocha JL, Tuon FF, Johnson JR. Sex, drugs, bugs, and age: rational selection of empirical therapy for outpatient urinary tract infection in an era of extensive antimicrobial resistance. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(1):115-21.
29. Dias VC, da Silva VL, Firmo Ede O et al. Distribution of ESBL-producing enterobacteria associated to community-acquired monomicrobial urinary tract infections and antimicrobial susceptibility trends over a 9-year period. *J Chemother*. 2012;24:178-81.
30. Salles MJ, Zurita J, Mejía C, Villegas MV; Latin America Working Group on Bacterial Resistance. Resistant gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiol Infect*. 2013;141:2459-72.
31. Abreu AG, Marques SG, Monteiro-Neto V, Gonçalves AG. Extended-spectrum β - lactamase-producing enterobacteriaceae in community-acquired urinary tract infections in São Luís, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2013;44:469-71.
32. Alves DMS, Edelweiss MK, Botelho LJ. Infecções comunitárias do trato urinário: prevalência e susceptibilidade aos antimicrobianos na cidade de Florianópolis. *Rev Bras Med Fam Comunidade*. 2016;11:1-12.

33. Brasil, Ministério da Saúde. Lei 9872 de 26 de janeiro de 1990. Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9782.htm
34. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:333-4.
35. Seki LM, Pereira PS, de Souza Mda P, Conceição Mde S, Marques EA, Porto CO, Colnago EM et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:274-7.
36. Volpato DE, de Souza BV, Dalla Rosa LG, Melo LH, Daudt CA, Deboni L. Use of antibiotics without medical prescription. *Braz J Infect Dis*. 2005;9:288-91.
37. ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada 44 de 26 de Outubro de 2010.
38. http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0020_05_05_2011.pdf/fa3ec1c1-8045-4402-b17f-ed189fb67ac8
39. Lynch JP 3rd, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14:199-210.
40. Moura ML, Boszczowski I, Mortari N, et al. The Impact of Restricting Over-the-Counter Sales of Antimicrobial Drugs: Preliminary Analysis of National Data. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e1605.
41. Kliemann BS, Levin AS, Moura ML, Boszczowski I, Lewis JJ. Socioeconomic Determinants of Antibiotic Consumption in the State of São Paulo, Brazil: The Effect of Restricting Over-The-Counter Sales. *PLoS One*. 2016;11(12): e0167885
42. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:347-54.
43. Rothman KJ. *Epidemiology: An Introduction*. Oxford: Oxford University Press, 2012.
44. Park R, O'Brien TF, Huang SS, Baker MA, Yokoe DS, Kullendorff M, Barrett C, Swift J, Stelling J; Centers for Disease Control and Prevention Epicenters Program. Statistical detection of geographic clusters of resistant *Escherichia coli* in a regional network with WHONET and SaTScan. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14:1097-1107.
45. Thaler DS, Head MG, Horsley A. Precision public health to inhibit the contagion of disease and move toward a future in which microbes spread health. *BMC Infect Dis*. 2019;19:120.
46. Almagor J, Temkin E, Benenson I, et al. The impact of antibiotic use on transmission of resistant bacteria in hospitals: Insights from an agent-based model. *PLoS One*. 2018;13:e0197111.
47. Kiffer CR, Camargo EC, Shimakura SE, et al. A spatial approach for the epidemiology of antibiotic use and resistance in community-based studies: the emergence of urban clusters of *Escherichia coli* quinolone resistance in Sao Paulo, Brasil. *Int J Health Geogr*. 2011 Feb 28;10:17.
48. Blaettler L, Mertz D, Frei R, Elzi L, et al. Secular trend and risk factors for antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates in Switzerland 1997-2007. *Infection*. 2009;37:534-9.
49. Zilberberg MD, Shorr AF. Secular trends in gram-negative resistance among urinary tract infection hospitalizations in the United States, 2000-2009. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:940-6.

50. Yolbaş I, Tekin R, Kelekci S, et al. Community-acquired urinary tract infections in children: pathogens, antibiotic susceptibility and seasonal changes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17:971-6.
51. Martínez EP, van Rosmalen J, Bustillos R et al. Trends, seasonality and the association between outpatient antibiotic use and antimicrobial resistance among urinary bacteria in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75:2314-2325.
52. Nii DM, Martins MAV, Fortaleza CMCB. Trends in antimicrobial susceptibility patterns in healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections: A joinpoint regression analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2021 Nov 2:1-3. doi: 10.1017/ice.2021.448. Epub ahead of print
53. de Azevedo Carazatto PZ, Calil FF, Fortaleza CMCB. Drivers of press media response to healthcare-associated infections caused by multidrug-resistant organisms: A report from Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020 Mar;41(3):372-373.
54. Garruto RM, Little MA, James GD, Brown DE. Natural experimental models: the global search for biomedical paradigms among traditional, modernizing, and modern populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10536-43.
55. McDowal D, McCleary R, Bartos BJ. Interrupted time series analysis. Oxford: Oxford University Press, 2019.
56. Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC, Ljung G. Time Series Analysis: Forecasting and Control (Wiley Series in Probability and Statistics). Hoboken: Wiley, 2015.
57. Imai C, Hashizume M. A systematic review of methodology: time series regression analysis for environmental factors and infectious diseases. *Trop Med Health*. 2015;43:1-9
58. Shadish WR, Cook TD, Campbell DT. Experimental and quasi-experimental designs for generalized causal inference. Belmont: Wadworth, 2002.
59. Bueloni TNV, Marchi D, Caetano C et al. Cefazolin-gentamicin versus taurolidine-citrate for the prevention of infection in tunneled central catheters in hemodialysis patients: A quasi-experimental trial. *Int J Infect Dis*. 2019;85:16-21.
60. World Health Organization. Natural experiments – building capacity for high-quality evaluations of public health interventions. Online: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/pages/news/news/2018/10/natural-experiments-building-capacity-for-high-quality-evaluations-of-public-health-interventions>
61. Kolbe AR, Hutson RA, Shannon H, Trzcinski E, Miles B, Levitz N et al. Mortality, crime and access to basic needs before and after the Haiti earthquake: a random survey of Port-au-Prince households. *Med Confl Surviv*. 2010;26:281-97.
62. Sargent RP, Shepard RM, Glantz SA. Reduced incidence of admissions for myocardial infarction associated with public smoking ban: before and after study. *BMJ*. 2004;328:977-80.
63. Cochrane collaboration. Interrupted time series analysis. 2012 Online: <http://epoc.cochrane.org/sites/epoc.cochrane.org/files/uploads/21%20Interrupted%20time%20series%20analyses%202013%2008%2012.pdf>

64. Jomar RT, Ramos DO, Fonseca VAO, Junger WL. Effect of the zero-tolerance drinking and driving law on mortality due to road traffic accidents according to the type of victim, sex, and age in Rio de Janeiro, Brazil: An interrupted time series study. *Traffic Inj Prev.* 2019;20:227-232.
65. Fortaleza CMCB. Evidence, rationality, and ignorance: Agnotological issues in COVID-19 science. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200475.
66. Wagner AK, Soumerai SB, Zhang F, Ross-Degnan D. Segmented regression analysis of interrupted time series studies in medication use research. *J Clin Pharm Ther.* 2002;27:299-309.
67. Hair Jr, JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE. Multivariate data analysis. Essex: Pearson Education, 2014.
68. Yolbaş I, Tekin R, Kelekci S, et al. Community-acquired urinary tract infections in children: pathogens, antibiotic susceptibility and seasonal changes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:971–976.
69. Lo DS, Shieh HH, Ragazzi SL, Koch VH, Martinez MB, Gilio AE. Community-acquired urinary tract infection: age and gender-dependent etiology. *J Bras Nefrol.* 2013;35:93– 98.
70. Kliemann BS, Levin AS, Moura ML, Boszczowski I, Lewis JJ. Socioeconomic Determinants of Antibiotic Consumption in the State of São Paulo, Brazil: The Effect of Restricting Over-The-Counter Sales. *PLoS One.* 2016;11:e0167885.
71. Castelo Branco Fortaleza CM, Moreira de Freitas F, da Paz Lauterbach G. Colonization pressure and risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical surgical intensive care unit in Brazil. *Am J Infect Control.* 2013;41:263-5
72. Alhmidi H, Cadnum JL, Koganti S, et al. Shedding of multidrug-resistant gram-negative bacilli by colonized patients during procedures and patient care activities. *Am J Infect Control.* 2020;48:1336-1340.
73. da Silveira M, da Cunha MLRS, de Souza CSM, et L. Nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among elderly living in nursing homes in Brazil: risk factors and molecular epidemiology. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2018;17:18.
74. Warren JL, Grandjean L, Moore DAJ, et al. Investigating spillover of multidrug-resistant tuberculosis from a prison: a spatial and molecular epidemiological analysis. *BMC Med.* 2018;16:122.
75. Hernandez-Santiago V, Davey PG, et al. Changes in resistance among coliform bacteraemia associated with a primary care antimicrobial stewardship intervention: A population-based interrupted time series study. *PLoS Med.* 2019 ;16:e1002825.
76. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents.* 2017 ;50:127-134.
77. Arnold JC, Day D, Hennessey M, et al "If It Works in People, Why Not Animals?": A Qualitative Investigation of Antibiotic Use in Smallholder Livestock Settings in Rural West Bengal, India. *Antibiotics (Basel).* 2021;10:1433.
78. Zintgraff J, Gagetti P, Napoli D, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from pediatric population in Argentina for the period 2006-2019. Temporal progression of serotypes distribution and antibiotic resistance. *Vaccine.* 2022;40:459-470.

79. Smith DR, Temime L, Opatowski L. Microbiome-pathogen interactions drive epidemiological dynamics of antibiotic resistance: A modeling study applied to nosocomial pathogen control. *Elife*. 2021;10:e68764.
80. Simmering JE, Polgreen LA, Cavanaugh JE, et al. Warmer Weather and the Risk of Urinary Tract Infections in Women. *J Urol*. 2021;205(2):500-506.
81. Moura ML, Boszczowski I, Blaque M, et al. Effect on Antimicrobial Resistance of a Policy Restricting Over-the-Counter Antimicrobial Sales in a Large Metropolitan Area, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2022;28:180-187.

APÊNDICE: ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO PLOS ONE

PLOS ONE

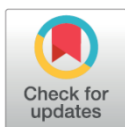
RESEARCH ARTICLE

Impact of restriction of over-the-counter sales of antimicrobials on antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from community-onset urinary tract infections in inner São Paulo State, Brazil

Fernanda Saad Rodrigues, Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza *

Department of Infectious Diseases, Botucatu School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), City of Botucatu, São Paulo State, Brazil

* carlos.fortaleza@unesp.br



OPEN ACCESS

Citation: Rodrigues FS, Amat HRA, Fortaleza CMCB (2021) Impact of restriction of over-the-counter sales of antimicrobials on antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from community-onset urinary tract infections in inner São Paulo State, Brazil. PLoS ONE 16(11): e0259632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259632>

Editor: Monica Cartelle Gestal, University of Georgia, UNITED STATES

Received: January 4, 2021

Accepted: October 22, 2021

Published: November 10, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259632>

Copyright: © 2021 Rodrigues et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Study database is included as a supplementary file.

Abstract

Background

Antimicrobial resistance in community-associated infections is an increasing worldwide concern. In low-to-middle income countries, over-the-counter (OTC) sales of antimicrobials without medical prescription have been blamed for increasing consumption and resistance. We studied the impact of restriction of OTC sales of antimicrobials in Brazil (instituted in October 2010) on resistance trends of *Escherichia coli* from community-onset urinary tract infections.

Methods

We analyzed monthly resistance trend of *Escherichia coli* from community-onset urinary tract infections from 2005 through 2018. The data were submitted to interrupted time series analysis in both linear and Poisson regression models.

Results

We found impact on cefazolin ($p < 0.001$) and amikacin ($p < 0.001$) resistance as immediate impact of the intervention, and no beneficial impact on resistance to ciprofloxacin, ceftriaxone or sulfamethoxazole-trimethoprim.

Conclusion

At the present study, we found that OTC sales restriction did not generally impact on antimicrobial resistance.

Funding: HRAA received a student research grant from São Paulo State Research Foundation (FAPESP, grant #2018/17210-1), with CMCBF as her advisor. The funding agency did not play a role in study design, methodology, nor in the writing of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: COUTI, community-onset urinary tract infections; ITS, interrupted time series (analysis); SMX-TMP, sulfamethoxazole-trimethoprim.

Background

In the past decade, the World Health Organization (WHO) recognized antimicrobial resistance as a major threat for public health worldwide. Countries were urged to develop their own action plans to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant pathogens [1, 2]. This is a major challenge for low-to-middle income countries, which have experienced recent increases in consumption of antimicrobials [3]. In those countries, over-the-counter (OTC) sales account for a relevant proportion of excessive use of antimicrobial agents [4, 5]. Laws restricting or prohibiting OTC sales of antimicrobials have been issued, but their impact is currently not straightforward [6, 7].

The population drivers of antimicrobial resistance are complex. A vast array of direct and herd effects interplay in the continuous process of emergence and spread of resistant bacterial strains [8]. Even though secular trends demonstrate clear association between the introduction of antimicrobials in clinical practice and the emergence and spread of resistance phenotypes, this association is not straightforward [9]. Therefore, the impact of regulations must be assessed not only regarding antimicrobial sales, but also focusing on their outcomes of interest, i.e., on the time trends of resistance among common pathogens.

A ban on non-prescription sales of antimicrobials in private drugstores was issued by Brazilian Sanitary Agency (ANVISA) in October 2010. The impact of this legal measure was uneven across the country. In fact, there was a significant reduction in sales of antimicrobials in pharmacies in the Southern and Southeastern states, which have a higher human development index (as compared to Northern, Northeastern and Midwest, and corresponds to the study zone). The effect was small in the less developed areas [10, 11]. Most importantly, the impact on antimicrobial resistance is uncertain in Brazil and in our region.

With that in mind, we use time series analysis to investigate the impact of ANVISA regulation on antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated in urine from patients with community-onset urinary tract infection (COUTI) in inner São Paulo State, Brazil.

Methods

Ethical approval

This study was approved by the Committee for Ethics in Human Research in Botucatu Medical School (register: CAAE 30000014.1.0000.5411), city of Botucatu, São Paulo State, Brazil. The ethics committee waived the requirement for informed consent. Data from all patients was initially checked for duplications, and subsequently anonymized before final validation and statistical analyses.

Study setting and design

We conducted a natural experiment study based on ecological data on incidence and antimicrobial resistance among *E. coli* isolates from COUTI in patients living in the Botucatu Health Administrative Area (BHAA), inner São Paulo State, Brazil. That area comprises 13 municipalities located around Botucatu city (22°53'25"S, 48°27'19"W), with a total of 300,000 inhabitants. Microbiological tests from public primary care units and outpatient services are performed in the laboratory from Botucatu Medical School teaching hospital.

Operational procedures

We collected data on microbiological results from COUTI in the period from January 2005 through December 2018. Those cultures were obtained from patients with suspected COUTI, cared for in public primary care and outpatient facilities in the BHAA. We recorded resistance

of *E. coli* isolates to several antimicrobials, mainly the most used for the treatment of COUTI in our country: cefazolin, ceftriaxone, ciprofloxacin, amikacin and sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX-TMP). We chose to address those antibiotics based on their use in outpatients or inpatients therapy of COUTI. Antimicrobial resistant tests were performed in Microscan Autoscan system (Beckman Coulter, Pasadena, CA) and followed standards from the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [12]. Duplicate results (defined as those obtained within a 30-day period) and those in which a nosocomial origin was proved were excluded from the study.

Time series analysis

Time series of monthly incidence of pathogens and resistance patterns were submitted to interrupted time series analysis (ITS) through segmented regression in the *itsa* package of STATA 14 (Statacorp, College Station, TX), as previously described [13]. Briefly, we analyzed the impact of the OTC sales ban in October 2010 on the immediate and late trends of antimicrobial resistance. We complemented this analysis with Poisson Regression models, adjusted for time trends and seasons.

In order to further investigate seasonality, Box-Jenkins models were fit to time series of incidence and antimicrobial resistance. We used the following parameters for models: regular (1,0,1), seasonal (1,0,1), with seasonality in 12 months [14]. Those analyses were performed in NCSS 9 (LLC, Kaysville, UT).

Results

In the study period, there were 40,814 positive cultures from COUTI patients, of which 31,162 (76.4%) recovered *E. coli*. The cumulative incidence was 10,686 per 100,000 inhabitants. There was a continuous trend towards increase in the isolates (incidence rate ratio [IRR] for month, 1.004; 95% confidence interval, 1.003–1.005; $P < 0.001$), with peaks in summer (IRR, 1.063; 95% 1.031–1.097; $P < 0.001$, as compared to winter). Those findings imply an average increasing trend in rates of 0.4% per month, as well as an overall increase of 6.3% during summer. While the overall increase may be attributable to greater access to diagnostic tests, the seasonal findings are consistent and were corrected excluding long term trends. Coherently, we found significant coefficients ($P < 0.001$) for autoregressive, moving average and—most importantly—seasonal parameters in Box Jenkins models.

Results from ITS analysis of resistance trends are presented in Fig 1 and Table 1 presents complementary season-adjusted Poisson regression models. Overall, immediate decrease in resistance was detected in all models only for cefazolin and amikacin. No beneficial impact on long-term trends was identified for the resistance to antimicrobials of interest.

In an opposite direction, there was immediate increase in resistance to ceftriaxone (ITS and Poisson models) and ciprofloxacin (Poisson regression), and an upward change in long-term trends of resistance to TMP-SMX (ITS and Poisson regression) and cefazolin (Poisson regression). The impact of seasons in Poisson multivariable models varied, and no resistance rate presented significant seasonal parameters in Box-Jenkins models.

Discussion

COUTI are unique among bacterial infections, because they are by far the ones for which cultures are most frequently collected. Therefore, they are expected to provide a reliable proxy of antimicrobial resistance trends in the community setting [15]. Our study aimed to analyze the impact of restriction of OTC sales of antimicrobials based on trends in resistance in *E. coli*, the most frequent uropathogen.

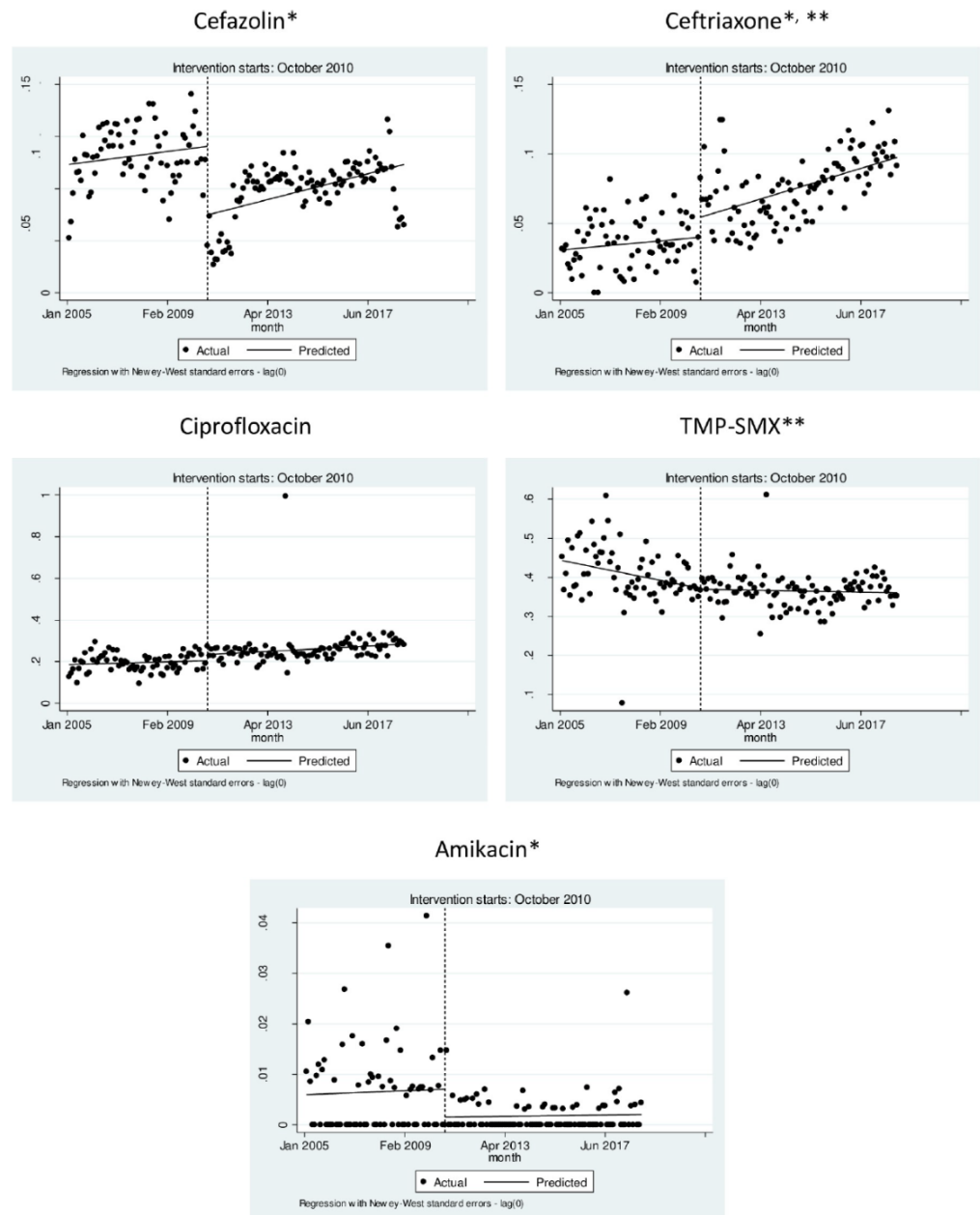


Fig 1. Interrupted time series (ITS) analysis (linear regression models) of time trends of antimicrobial resistance (expressed in Y axis in proportion) in *Escherichia coli* recovered from urine cultures of patients with community-onset urinary tract infection in inner São Paulo State, Brazil, before and after the prohibition of over-the-counter sales of antimicrobials (antimicrobial sales without medical prescription). TMP-SMX, Sulfamethoxazole-trimethoprim. Notice that the number of months with zero resistance to Amikacin limits the accuracy of ITS. *Immediate impact of the intervention ($P < 0.05$). ** Impact of intervention on time trends ($P < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259632.g001>

Table 1. Poisson regression analysis (adjusted for seasonal variation) of interrupted time series of resistance trends in *Escherichia coli* recovered from urine cultures of patients with community-onset urinary tract infection in inner São Paulo State, Brazil, before and after the prohibition of over-the-counter sales of antimicrobials (antimicrobial sales without medical prescription).

Antimicrobial resistance / predictors	IRR (95%CI)	P
Cefazolin		
Time (months)	1.001 (1.000–1.003)	0.03
Intervention*	0.588 (0.545–0.634)	<0.001
Intervention_time**	1.002 (1.001–1.004)	0.007
Season		
Winter (reference)
Spring	0.985 (0.938–1.034)	0.55
Summer	0.999 (0.953–1.047)	0.98
Autumn	1.059 (1.011–1.111)	0.02
Ceftriaxone		
Time (months)	1.004 (0.998–1.010)	0.23
Intervention*	1.334 (1.041–1.709)	0.02
Intervention_time**	1.003 (0.997–1.009)	0.39
Season		
Winter (reference)
Spring	0.932 (0.825–1.052)	0.26
Summer	1.010 (0.898–1.137)	0.86
Autumn	0.925 (0.820–1.045)	0.21
Cipro		
Time (months)	1.002 (0.999–1.005)	0.10
Intervention*	1.137 (1.017–1.271)	0.02
Intervention_time**	0.999 (0.997–1.002)	0.88
Season		
Winter (reference)
Spring	0.931 (0.873–0.994)	0.03
Summer	1.074 (1.010–1.142)	0.02
Autumn	0.964 (0.904–1.027)	0.26
SMX-TMP		
Time (months)	0.997 (0.995–0.999)	0.01
Intervention*	0.971 (0.894–1.056)	0.50
Intervention_time**	1.002 (1.000–1.004)	0.03
Season		
Winter (reference)
Spring	0.976 (0.926–1.028)	0.37
Summer	1.005 (0.955–1.057)	0.85
Autumn	1.002 (0.951–1.054)	0.95
Amikacin		
Time (months)	1.003 (0.988–1.017)	0.35
Intervention*	0.181 (0.075–0.437)	<0.001
Intervention_time**	1.003 (0.985–1.021)	0.38
Season		
Winter (reference)
Spring	0.969 (0.518–1.810)	0.92
Summer	1.131 (0.636–2.012)	0.67

(Continued)

Table 1. (Continued)

Antimicrobial resistance / predictors	IRR (95%CI)	P
Autumn	1.272 (0.726–2.222)	0.40

Note. Significant ($P < 0.05$) results are presented in boldface. IRR, Incidence Rate Ratio; CI, Confidence Interval; SMX-TMP, sulfamethoxazole-trimethoprim.

* Immediate impact of the intervention.

** Impact of intervention on time trends.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259632.t001>

Even though the effect of the restriction on sales of antimicrobials in São Paulo state was relevant [11, 12], we found little to no impact on antimicrobial resistance in COUTI *E. coli*. Trends of resistance to ciprofloxacin were not impacted. Resistance to ceftriaxone accelerated after 2010, while the decreasing trend in TMP-SMX resistance slowed. Immediate or long-term changes after the sales restriction was noticed only for first generation cephalosporins and aminoglycosides, which are not “first line” therapeutic choices for COUTI [16].

Disappointing as our findings may be, they are evidently not an argument against restricting OTC sales of antimicrobials. Instead, they point out that restriction was not sufficient for stopping increasing trends in resistance to widely used therapeutic agents. Presumably, there are other drivers of the emergence and spread of resistance. Regarding *E. coli* and other Enterobacteriaceae, the fecal carriage of resistant strains in community settings [17], arising from food chain and eventually spread by international travel [18] may be among those drivers. One health approaches have demonstrated the importance of antimicrobial use in agriculture and the dispersion of those drugs in the environment in the causal chain of resistance. Policies that do not address those drivers from a wide ecological perspective are therefore likely to fail [19].

Our study was limited by its small geographic range and relatively short-term analysis. Also, it addressed only one pathogen from a single clinical syndrome, albeit the most frequently identified in the community setting. Finally, it did not include in its analysis the antimicrobial resistance arising and spreading within healthcare-settings. In those settings, other aspects such as hospital connectiveness and patient sharing may play a role in the dissemination of resistance phenotypes [20]. However, there are also strengths in our study. Antimicrobial resistance rates evolve and will obviously not change from one day to another, so our long-term analysis seemed appropriate. We analyzed results from more than 30,000 nonduplicate urine cultures collected over 14 years, using the appropriate ITS approach for natural experiments [13].

Conclusion

In conclusion, we found that legislation of OTC sales of antimicrobials in drugstores did not present a relevant impact on the resistance of *E. coli* to antimicrobials widely used in clinical practice. Therefore, wider interventions should be considered for prevention and control of antimicrobial resistance in community settings.

Supporting information

S1 File.
(XLSX)

Acknowledgments

This study is part of PhD thesis of FSR, with CMCBF as her advisor.

Author Contributions

Conceptualization: Fernanda Saad Rodrigues, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Data curation: Fernanda Saad Rodrigues, Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Formal analysis: Fernanda Saad Rodrigues, Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Funding acquisition: Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Investigation: Fernanda Saad Rodrigues, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Methodology: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Project administration: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Supervision: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Validation: Fernanda Saad Rodrigues, Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Visualization: Fernanda Saad Rodrigues, Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Writing – original draft: Fernanda Saad Rodrigues, Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Writing – review & editing: Fernanda Saad Rodrigues, Helena Ribeiro Aiello Amat, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

References

1. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance. Draft global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: WHO, 2015. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_20-en.pdf
2. Munkholm L, Rubin O. The global governance of antimicrobial resistance: a cross-country study of alignment between the global action plan and national action plans. *Global Health*. 2020; 16:109. <https://doi.org/10.1186/s12992-020-00639-3> PMID: 33176810
3. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115:E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115> PMID: 29581252
4. Sakeena MHF, Bennett AA, McLachlan AJ. Non-prescription sales of antimicrobial agents at community pharmacies in developing countries: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 52:771–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.022> PMID: 30312654
5. Auta A, Hadi MA, Oga E, Adewuyi EO, Abdu-Aguye SN, Adeloye D, et al. Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2019; 78:8–18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.07.001> PMID: 29981773
6. Wirtz VJ, Herrera-Patino JJ, Santa-Ana-Tellez Y, Dreser A, Elseviers M, Vander Stichele RH. Analysing policy interventions to prohibit over-the-counter antibiotic sales in four Latin American countries. *Trop Med Int Health* 2013; 18:665–73. <https://doi.org/10.1111/tmi.12096> PMID: 23551290
7. Jacobs TG, Robertson J, van den Ham HA, Iwamoto K, Bak Pedersen H, Mantel-Teeuwisse AK. Assessing the impact of law enforcement to reduce over-the-counter (OTC) sales of antibiotics in low- and middle-income countries; a systematic literature review. *BMC Health Serv Res*. 2019; 19:536. <https://doi.org/10.1186/s12913-019-4359-8> PMID: 31366363
8. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8:347–54. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010312> PMID: 11971765
9. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem Pharmacol*. 2017; 133:4–19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.001> PMID: 27720719

10. Moura ML, Boszczowski I, Mortari N, Barrozo LV, Chiaravalloti Neto F, Lobo RD, et al. The Impact of Restricting Over-the-Counter Sales of Antimicrobial Drugs: Preliminary Analysis of National Data. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94:e1605. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001605> PMID: [26402824](#)
11. Kliemann BS, Levin AS, Moura ML, Boszczowski I, Lewis JJ. Socioeconomic Determinants of Antibiotic Consumption in the State of São Paulo, Brazil: The Effect of Restricting Over-The-Counter Sales. *PLoS One*. 2016; 11:e0167885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167885> PMID: [27941993](#)
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
13. Linden A. Conducting interrupted time-series analysis for single- and multiple-group comparisons. *The Stata Journal* 2015; 15:408–500.
14. Helfenstein U. Box-Jenkins modelling of some viral infectious diseases. *Stat Med*. 1986; 5:37–47. <https://doi.org/10.1002/sim.4780050107> PMID: [3961314](#)
15. Martínez EP, van Rosmalen J, Bustillos R, Natsch S, Mouton JW, Verbon A. Trends, seasonality and the association between outpatient antibiotic use and antimicrobial resistance among urinary bacteria in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*. 2020; 75:2314–2325. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa165> PMID: [32417922](#)
16. Kang CI, Kim J, Park DW, Kim BN, Ha US, Lee SJ, et al. Clinical Practice Guidelines for the Antibiotic Treatment of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infect Chemother*. 2018; 50:67–100. <https://doi.org/10.3947/ic.2018.50.1.67> PMID: [29637759](#)
17. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 326:744–58. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-13> PMID: [24092853](#)
18. Ruppé E, Andremont A, Armand-Lefèvre L. Digestive tract colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae in travellers: An update. *Travel Med Infect Dis*. 2018; 21:28–35. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2017.11.007> PMID: [29155322](#)
19. Wallinga D, Rayner G, Lang T. Antimicrobial resistance and biological governance: explanations for policy failure. *Public Health*. 2015; 129:1314–25. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2015.08.012> PMID: [26454427](#)
20. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019; 4:1919–1929. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8> PMID: [31358985](#)