

Análise Microbiana aos Ralos de Lavatórios do Hospital Pêro da Covilhã e Relatório de Estágio em Análises Clínicas

Versão Final Após Defesa

Miguel Amaral Neto

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Andreia Sofia dos Reis Monteiro
Co-orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

julho de 2024

Declaração de Integridade

Eu, Miguel Amaral Neto, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12425 de Bioquímica da Faculdade Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 31/07/2024

Miguel Amaral Neto

(Miguel Amaral Neto)

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Dr^a Andreia Monteiro, quero agradecer por toda a ajuda e conselhos ao longo deste estágio e, sobretudo, quero agradecer por toda a paciência e tempo dedicado a este projeto de investigação.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Samuel Silvestre, quero agradecer por toda a disponibilidade e apoio prestado durante o estágio.

À Doutora Paula Gouveia, tenho a agradecer a disponibilidade e apoio prestado durante a elaboração deste projeto de investigação.

À Enfermeira Paula Brito, pela ajuda prestada durante a realização deste projeto de investigação.

Ao Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Cova da Beira, em especial à Doutora Patrícia Ibarzabal, por me ter permitido realizar este estágio e por toda a sua disponibilidade. A todos os colaboradores por me proporcionarem uma excelente integração, pelo ótimo ambiente laboral e por tudo o que com eles aprendi.

À Unidade de Cuidados Intensivos e aos Serviços de Medicina I e Medicina II, tenho a agradecer por toda a disponibilidade e por permitirem a realização do projeto de investigação.

Ao meu amigo e colega de estágio, João Crucho, pelo apoio, disponibilidade e amizade ao longo de todos estes anos. Obrigado por teres partilhado esta experiência comigo, foi mesmo muito importante, pois ajudou a torná-la melhor.

À minha namorada e melhor amiga, Joana, por estar sempre presente para me apoiar nos bons e maus momentos. E por me motivar todos os dias a dar o melhor em tudo o que faço.

À minha família e amigos, em especial aos meus pais e avós, por todos os incentivos e apoio ao longo de todo o meu percurso académico.

Resumo

Um laboratório clínico é uma instalação que tem como principais objetivos a recolha e tratamento de amostras biológicas dos utentes, de modo que possam ser feitas determinações analíticas fiáveis e válidas em tempo útil, de maneira a poder ser estabelecido um diagnóstico clínico para que, posteriormente, caso seja necessário, se possa indicar uma terapia adequada ao diagnóstico do utente. O Laboratório de Patologia Clínica (LPC) da Unidade Local de Saúde da Cova da Beira é constituído por várias secções de diagnóstico, pelo que o presente relatório retrata a passagem pelas secções de Imunoquímica, Microbiologia e Hematologia, tendo sido desenvolvido um projeto de investigação na secção de Microbiologia.

Nas últimas décadas, o aumento do número de infeções por microrganismos multirresistentes levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a classificar a resistência aos antibióticos como a principal ameaça do século XXI contra a saúde pública. Estas bactérias multirresistentes são responsáveis por provocar infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS), estando associadas a prognósticos desfavoráveis. Estas bactérias possuem a capacidade de formar biofilmes, sendo a canalização hospitalar um dos locais onde estes se podem formar. Este facto levou a que os lavatórios fossem identificados como potenciais fontes de transmissão de microrganismos multirresistentes causadores de infeções aos doentes hospitalizados localizados a menos de 1 metro de distância. Neste sentido, o objetivo deste projeto de investigação foi avaliar, durante um período de 4 semanas, a presença de três microrganismos multirresistentes na canalização de 24 lavatórios, distribuídos por três serviços do Hospital Pêro da Covilhã, tendo sido testada em simultâneo a eficácia de dois desinfetantes na eliminação dos biofilmes. Os microrganismos estudados foram o *Staphylococcus aureus metilina resistente* (MRSA), a *Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemases* (KPC) e o *Acinetobacter baumannii*, enquanto os desinfetantes comparados foram o *Klorleen Plus (Imporquímica®)* e o *Granulado Desinfetante Efervescente (Agadesinfect®)*. A recolha de dados teve início no dia 22 de janeiro de 2024 tendo terminado a 15 de abril, durante esse período foram recolhidas 190 amostras a partir das quais foram gerados 570 resultados. Dos resultados obtidos 48 (8,4 %) foram positivos para os microrganismos em estudo, sendo 25 (4,4 %) positivos para MRSA e 23 (4,0 %) positivos para KPC. Relativamente ao *Acinetobacter baumannii*, não foi registado qualquer caso positivo em nenhum dos lavatórios estudados. Com base nos dados do crescimento destes microrganismos ao longo das semanas de estudo, foi possível avaliar qual o desinfetante mais eficaz na eliminação do

biofilme, sendo que dos dois desinfetantes o *Granulado Desinfetante Efervescente* foi aquele que apresentou melhor eficácia na eliminação dos biofilmes. Com base no número de IACS em 2023 no Hospital Pêro da Covilhã e tendo em conta os dados da eficácia do referido Granulado na eliminação do biofilme, justifica-se a necessidade de criação de um protocolo de desinfeção periódica dos lavatórios com este desinfetante com o objetivo de controlar e diminuir o número de IACS provocadas por estes microrganismos multirresistentes nesta unidade hospitalar.

Palavras-chave

Biofilmes;Lavatórios;*Staphylococcus aureus* *meticilina* *resistente*;*Klebsiella pneumoniae* *produtora de carbapenemases*;*Acinetobacter baumannii*;Relatório de Estágio;Análises Clínicas.

Abstract

A clinical laboratory is a facility whose main objectives are to collect and process biological samples from patients, so that reliable and valid analytical determinations can be made in good time, so that a clinical diagnosis can be established and then, if necessary, appropriate therapy can be indicated for the patient's diagnosis. The Clinical Pathology Laboratory of the Cova da Beira Local Health Unit is made up of various diagnostic sections, so this report describes the time spent in the Immunochemistry, Microbiology and Hematology sections, and a research project that was carried out in the Microbiology section.

In recent decades, the World Health Organization (WHO) classified antibiotic resistance as the main public health threat of the 21st century. These multi-resistant microorganisms are responsible for causing very serious nosocomial infections and are associated with unfavorable prognoses. These bacteria have the ability to form biofilms, and hospital plumbing is one of the places where they can form. This has led to sinks being identified as potential sources of transmission of multidrug-resistant microorganisms that cause infections in hospitalized patients located within 1 meter. With this in mind, the aim of this research project was to assess the presence of three multi-resistant microorganisms in 24 sinks, over a 4-week period, spread across three departments at the Hospital Pêro da Covilhã, while simultaneously testing the effectiveness of two disinfectants in eliminating biofilms. The microorganisms studied were *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae* (KPC) and *Acinetobacter baumannii*, while the disinfectants compared were *Klorkleen Plus (Imporquímica®)* and *Effervescent Disinfectant Granules (Agadesinfect®)*. Data collection began on January 22, 2024, and ended on April 15, during which 190 samples were collected and 570 results were generated. Of the results, 48 (8,4%) were positive for the microorganisms under study, with 25 (4,4%) positive for MRSA and 23 (4,0%) positive for KPC. No positive cases of *A. baumannii* were recorded in any of the sinks studied. Based on the data it was possible to assess which disinfectant was most effective in eliminating biofilms, and Effervescent Disinfectant Granules was the one that was most effective in the elimination. Considering the number of nosocomial infections in 2023 at Hospital Pêro da Covilhã and the data on the efficiency of Granulated Disinfectant, it justifies the need to create a protocol for periodic disinfection of sinks with this disinfectant to

control and reduce the number of nosocomial infections caused by these multidrug-resistant microorganisms in this hospital unit.

Keywords

Biofilms; Sinks; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae*; *Acinetobacter baumannii*; Internship Report; Clinical Analysis.

Índice

Objetivo Geral	1
Capítulo 1: Projeto de Investigação	3
1. Introdução	3
1.1. Biofilmes em lavatórios hospitalares	3
1.2. <i>One Health</i>	4
1.2.1. Resistência aos Antibióticos	5
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente	8
1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases	11
1.5. <i>Acinetobacter baumannii</i>	12
1.6. Agentes Antimicrobianos	15
2. Objetivos do Projeto de Investigação	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Seleção de amostras	17
3.2. Processamento das amostras	18
4. Resultados	19
4.1. Unidade de Cuidados Intensivos	19
4.2. Serviço de medicina I	19
4.3. Serviço de medicina II	21
5. Discussão de Resultados	23
6. Conclusão e Perspetivas Futuras	28
Capítulo 2: Relatório de Estágio	29
1. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica	29
2. Procedimento Analítico	29
2.1. Fase Pré-Analítica	30
2.2. Fase Analítica	31
2.3. Fase Pós-Analítica	32
3. Laboratório de Imunoquímica	33
3.1. <i>Cobas® Série 8000</i>	33
3.1.1. <i>Cobas® Série 8000</i> : Módulo ISE	34
3.1.2. <i>Cobas® Série 8000</i> : Módulo c502	34
3.1.3. <i>Cobas® Série 8000</i> : Módulo e602	35

3.2. Cobas® e 411	36
3.3. Abbott Architect i2000SR	37
3.4. ImmunoCAP™ 250	38
3.5. Atellica® NEPH 630 System	40
3.6. Eletroforese de Proteínas Séricas	41
3.6.1. Sebia CAPILLARYS 3 OCTA	41
3.6.2. Sebia HYDRASIS Focusing	42
3.7. Atellica® 1500 Automated Urinalysis System	44
3.8. Testes Rápidos	45
3.8.1. Drogas de Abuso	45
3.8.2. Teste de Gravidez	46
4. Laboratório de Microbiologia	46
4.1. Meios de Cultura	47
4.1.1. Meios Líquidos	48
4.1.2. Meios Sólidos	48
4.2. Tipos de Inoculação	52
4.2.1. Inoculação em placa de Petri	52
4.2.2. Inoculação em caldo de cultura	53
4.2.3. Inoculação por esfregaço	53
4.2.4. Inoculação em ágar inclinado	53
4.3. Produtos Biológicos	54
4.3.1. Urina	54
4.3.2. Fezes	55
4.3.3. Aparelho Respiratório	58
4.3.3.1. Expetorações e Secreções Brônquicas	58
4.3.3.2. Aspirado Brônquico e Lavado Bronco-Alveolar	59
4.3.4. Hemoculturas	59
4.3.5. Cateter	61
4.3.6. Produtos em Zaragatoa	62
4.3.6.1. Exsudado Vaginal e Uretral	62
4.3.6.2. Exsudado Nasal	62
4.3.6.3. Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i>	63
4.3.6.4. Pesquisa de <i>Acinetobacter baumannii</i>	63
4.3.7. Líquidos Biológicos	64
4.3.7.1. Líquido Pleural	64
4.3.7.2. Líquido Ascítico	64
4.3.7.3. Líquido Pericárdico	65

4.3.7.4. Líquido Cefalorraquidiano	66
4.3.7.5. Líquido Articular/Sinovial	66
4.3.7.6. Pus	67
4.3.7.7. Biopsia	67
4.4. Análise Microscópica	68
4.4.1. Coloração de Gram	68
4.4.2. Coloração de Ziehl-Neelsen	69
4.5. Testes de Identificação e Sensibilidade aos Antibióticos	70
4.5.1. Testes Manuais	70
4.5.1.1. Teste da Catalase	70
4.5.1.2. Teste da Coagulase	71
4.5.1.3. Teste da Oxidase	71
4.5.1.4. Teste da Urease	72
4.5.1.5. Teste da Optoquina	72
4.5.1.6. Teste da Novobiocina	72
4.5.1.7. Tipagem	73
4.5.1.8. Teste rápido para pesquisa de <i>Staphylococcus</i> <i>Meticilina resistente</i>	73
4.5.1.9. ETEST®	74
4.5.2. Testes Automáticos	74
4.6. Testes Serológicos	76
4.6.1. Teste Rosa Bengala	76
4.6.2. Teste Wright	76
4.6.3. Teste Widal	77
4.6.4. <i>Rapid Plasma Reagin e Venereal Disease Research</i> <i>Laboratory</i>	77
4.7. Testes Biologia Molecular	77
4.7.1. Teste Xpert® MTB/RIF	79
4.7.2. Teste Xpert® Carba-R	79
4.7.3. Teste Xpert® MRSA NxG	79
4.7.4. Teste Xpert® CT/NG	80
5. Laboratório de Hematologia	80
5.1 Hematopoiese	81
5.2. Hemograma	83
5.2.1. Eritrograma	84
5.2.1.1. Índices Hematimétricos	85
5.2.1.2. <i>Red Cell Distribution Width</i>	86

5.2.1.3. Reticulócitos	86
5.2.2. Leucograma	87
5.2.3. Plaquetograma	89
5.3. Análise Microscópica	90
5.3.1. Técnicas de Coloração	91
5.3.1.1. Coloração de <i>May-Grunwald-Giemsa</i>	91
5.3.1.2. Coloração de <i>Perls</i>	91
5.3.2. Teste de Falciformação	92
5.4. Hemoglobina Glicada, A2 e Fetal	92
5.5. Velocidade de Sedimentação	94
5.6. Hemóstase	95
5.6.1. Vasoconstrição	95
5.6.2. Hemóstase Primária	96
5.6.3. Coagulação	96
5.6.4. Fibrinólise	97
5.6.5. Estudo da Hemóstase	97
5.6.6. Testes de Rotina	99
5.6.7. Estudo da Trombofilia	101
5.6.7.1. Antitrombina	102
5.6.7.2. Proteína C	102
5.6.7.3. Proteína S	102
5.6.7.4. Anticoagulante Lúpico	103
5.6.7.5. Fator de Von Willebrand	104
5.7. Testes Biologia Molecular	104
5.7.1. Teste Xpert® HemosIL FII & FV	104
5.7.2. Teste Xpert® BCR-ABL Ultra	105
5.8. Citometria de Fluxo	105
6. Conclusões Balanço Final da Aprendizagem	107
Bibliografia	108

Lista de Figuras

Figura 1: Visualização do crescimento dos microrganismos. (A) – MRSA (colónias verdes), (B) – KPC (colónias verde-escuras/azul), (C) – A. Baumannii (colónias lactose negativas)	18
Figura 2: Representação do sistema pré-analítico <i>Cobas® p612</i> utilizado no SPC [23]	31
Figura 3: Representação do <i>Cobas® Serie 8000</i> existente no SPC [26]	33
Figura 4: Representação do <i>Cobas® e 411</i> existente no SPC [31]	37
Figura 5: Representação do <i>Architect i2000SR</i> existente no SPC [32]	38
Figura 6: Representação do <i>ImmunoCAP™ 250</i> existente no SPC [34]	39
Figura 7: Representação do <i>Atellica® NEPH 630 System</i> existente no SPC [36]	40
Figura 8: Representação do <i>CAPILLARYS 3 OCTA</i> existente no SPC [38]	42
Figura 9: Proteinograma (Albumina, Alfa-globulina (alfa-1 e alfa-2), Beta-globulina (beta-1 e beta-2) e Gama-globulina)	42
Figura 10: Representação do <i>HYDRASIS Focusing</i> existente no SPC [40]	43
Figura 11: Exemplo de um gel de Imunofixação Sérica	43
Figura 12: Exemplo de um gel de Perfil Urinário	44
Figura 13: Exemplo de um gel de Bence-Jones	44
Figura 14: Representação do <i>Atellica® 1500 Automated Urinalysis System</i> existente no SPC [42]	45
Figura 15: (A) - Representação da inoculação por estria simples. (B) - Representação da inoculação por esgotamento do produto [45]	53
Figura 16: Representação de inoculação por sementeira em rede [45]	53
Figura 17: Exemplo de uma garrafa de hemocultura	61
Figura 18: Equipamento <i>BACT/ALERT® 3D (BioMérieux)</i> usado no Laboratório de Microbiologia da ULS Cova da Beira [59]	61
Figura 19: Equipamento <i>PREVI® Color Gram (BioMérieux)</i> usado no Laboratório de Microbiologia [73]	69
Figura 20: (A) - Bactérias Gram Positivas coradas de azul/roxo. (B) - Bactérias Gram Negativas coradas de rosa [45]	69
Figura 21: Equipamento <i>Aerospray® TB Slide Stainer / Cytocentrifuge</i> usado no Laboratório de Microbiologia [74]	70
Figura 22: (A) – Bacilos álcool-ácido resistentes corados de rosa. (B) – Bacilos	

álcool-ácido não resistentes coradas de azul [45]	70
Figura 23: Equipamento <i>VITEK®2 COMPACT (BioMérieux)</i> usado no laboratório de microbiologia e cartas usadas para identificação e sensibilidade aos antibióticos [74]	76
Figura 24: Equipamento <i>GeneXpert®</i> usado no SPC e um exemplo de um cartucho usado pelo equipamento [76]	79
Figura 25: Processo Hematopoiético [101]	81
Figura 26: Regulação da Hematopoiese [101]	83
Figura 27: (A) – <i>Yumizen H2500 (Horiba Medical)</i> [135], (B) – <i>Yumizen SPS (Horiba Medical)</i> [117] utilizados no laboratório de hematologia	84
Figura 28: Matriz LMNE fornecida pelo <i>Yumizen H2500</i> . (1) – Linfócitos; (2) – Monócitos; (3) – Neutrófilos; (4) – Eosinófilos; (5) – Granulócitos Imaturos; (6) – Monócitos Imaturos; (7) – Linfócitos Imaturos; (8) – Eritroblastos ou Agregados Plaquetários; (9) – Linfócitos atípicos; (10) – Barulho de fundo baixo; (11) – Barulho de fundo alto [137]	89
Figura 29: <i>CellaVision® DC-1</i> utilizado no laboratório de hematologia e software de visualização de imagens acoplado [116]	91
Figura 30: Eritrócito Falciforme [101]	92
Figura 31: <i>ADAMS™ A1c HA-8180T (ARKRAY)</i> utilizado no laboratório de hematologia e gráfico com os picos de absorvância de cada tipo de hemoglobina vs tempo (s) [108]	94
Figura 32: <i>Sediplus® S 2000</i> utilizado no laboratório de hematologia [107]	95
Figura 33: <i>ACL TOP 750 CTS (Werfen)</i> utilizado no laboratório de hematologia [119]	98
Figura 34: <i>Citometro BD FACSCalibur™</i> utilizado no laboratório de hematologia [142]	106

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista da OMS com a relevância clínica dos microrganismos e as suas resistências, bem como a prioridade para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos [5]	7
Tabela 2: Caracterização dos resultados da pesquisa de MRSA na UCI	19
Tabela 3: Caracterização dos resultados da pesquisa de KPC na UCI	19
Tabela 4: Caracterização dos resultados da pesquisa de <i>Acinetobacter baumannii</i> na UCI	19
Tabela 5: Caracterização dos resultados da pesquisa de MRSA no serviço de medicina I	20
Tabela 6: Caracterização dos resultados da pesquisa de KPC no serviço de medicina I	20
Tabela 7: Caracterização dos resultados da pesquisa de <i>Acinetobacter baumannii</i> no serviço de medicina I	20
Tabela 8: Caracterização dos resultados da pesquisa de MRSA no serviço de medicina II	21
Tabela 9: Caracterização dos resultados da pesquisa de KPC no serviço de medicina II	21
Tabela 10: Caracterização dos resultados da pesquisa de <i>Acinetobacter baumannii</i> no serviço de medicina II	22
Tabela 11: Meios líquidos utilizados no laboratório de microbiologia	48
Tabela 12: Meios sólidos utilizados no laboratório de microbiologia	48
Tabela 13: Cartas de Identificação disponíveis no laboratório de microbiologia ...	75
Tabela 14: Cartas de TSA disponíveis no laboratório de microbiologia	75
Tabela 15: Densidades óticas da suspensão salina	75
Tabela 16: Número e respetivo nome dos fatores da coagulação	97

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AL	Anticoagulante Lúpico
APC	Proteína C Ativada
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
B.A.A.R	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
dRVVT	Veneno de Víbora de Russel diluído
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EIA	Ensaio Imunoenzimático
EPO	Eritropoietina
ERC	<i>Enterobacteriales</i> resistentes aos carbapenemos
ERPI	Estruturas Residenciais Para Idosos
ESBL	<i>Enterobacteriales</i> produtoras de beta-lactamases de espectro alargado
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hct	Hemacrócito
HGT	Transferência Horizontal de Genes
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSC	Células Estaminais Hematopoiéticas
IACS	Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde
Ig	Imunoglobulina
INSA	Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge
ISE	Eléctrodo Seletivo de Iões
IST	Infeções Sexualmente Transmissíveis
ITU	Infeções Associadas ao Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases
LBA	Lavados Bronco-Alveolares
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LMC	Leucemia Mielóide Crónica
LPC	Laboratório de Patologia Clínica

MPV	Volume Plaquetar Médio
MRSA	<i>Staphylococcus aureus meticilina resistente</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus meticilina sensível</i>
NaDCC	Dicloroisocianurato de Sódio
NEQAS	Do inglês “ <i>United Kingdom National External Quality Assessment</i> ”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	Do inglês “ <i>Penicillin Binding Protein</i> ”
PCR	Do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PDF	Produtos de Degradação da Fibrina
PDW	Amplitude de Distribuição das Plaquetas
QS	Do inglês “ <i>Quorum Sensing</i> ”
RDW	Do inglês “ <i>Red Cell Distribution Width</i> ”
RNA	Ácido Ribonucleico
SCT	Do inglês “ <i>Silica Clotting Time</i> ”
SEQC	Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratórios
SPC	Serviço de Patologia Clínica
SSCmec	Do inglês “ <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> ”
TP	Tempo de Protrombina
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antibióticos
TSS	Técnico Superior de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UL-PPCIRA	Unidade Local do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e Resistência aos Antimicrobianos
ULR	Unidades de Luz Reativas
VDRL	Do inglês “ <i>Venereal Disease Research Laboratory</i> ”
VS	Velocidade de Sedimentação
VRSA	<i>Staphylococcus aureus vancomicina resistente</i>

Objetivo Geral

Durante o período de 18 de setembro a 29 de maio (1240 horas) foi desenvolvido o presente trabalho, que se encontra dividido em duas partes: a primeira corresponde ao projeto de investigação com o objetivo de adquirir experiência na área de investigação clínica através da elaboração de um estudo a nível hospitalar com a redação do referido projeto; a segunda corresponde ao estágio curricular que teve como finalidade proporcionar o contacto direto e prático na aquisição de competências laborais nas áreas de, imunquímica, microbiologia e hematologia, sendo que um relatório descritivo das diferentes áreas abordadas durante o estágio foi elaborado e incluído neste documento.

Capítulo 1: Projeto de Investigação

1. Introdução

1.1. Biofilmes em lavatórios hospitalares

Nas últimas décadas, a canalização hospitalar foi reconhecida como um potencial reservatório de bactérias multirresistentes responsáveis por causar infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS). O impacto do ambiente hospitalar na transmissão de bactérias multirresistentes tem aumentado nos últimos anos, sendo os lavatórios e torneiras identificados como possíveis fontes de transmissão de bactérias multirresistentes, incluindo *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenemos (ERC), bacilos Gram-Negativos multirresistentes e *Enterobacteriales* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) [1,2].

O facto dos salpicos de água e aerossóis gerados pela utilização dos lavatórios poderem alcançar até 1 metro de distância apresenta-se como um perigo para os doentes hospitalizados situados dentro desse raio, uma vez que aumenta o risco de exposição a microrganismos multirresistentes, caso o lavatório esteja contaminado. Tal exposição pode levar ao desenvolvimento de novas infeções, que anteriormente não estavam presentes, resultando em complicações de saúde, sendo que em casos graves (ex: doentes imunodeprimidos) isso pode ser fatal [2].

Algumas bactérias multirresistentes encontradas na canalização hospitalar são difíceis de erradicar através dos métodos convencionais, devido à capacidade de estas formarem biofilmes, apesar de não ser uma característica universal de todas as bactérias multirresistentes é comum a algumas delas tornando os métodos convencionais de desinfeção pouco eficazes [1]. Os biofilmes apresentam-se como comunidades estruturadas de microrganismos que se podem encontrar aderidos a superfícies bióticas, como é o caso de tecidos vivos, ou a superfícies abióticas, como por exemplo metais e plásticos, entre outros. Estes biofilmes apresentam uma matriz extracelular bastante complexa que protege os microrganismos contra os fatores adversos, permitindo que estes sobrevivam em condições completamente desfavoráveis. Estes também possuem canais que permitem a circulação de água e nutrientes, para além da capacidade de remover resíduos tóxicos. Os biofilmes podem ser formados por uma só espécie de microrganismo ou podem ser formados por uma vasta diversidade microbiana, o que significa que múltiplas espécies de

microrganismos, incluindo bactérias, fungos e algas, podem coabitar contribuindo para a resiliência e capacidade dos biofilmes se adaptaram aos diferentes ambientes. Para além disso, as células que formam o biofilme conseguem comunicar entre si, processo conhecido como *Quorum Sensing* (QS), processo coordenado que leva à expressão de genes relacionados com a formação e manutenção do biofilme [1-3].

Atualmente, evidências acerca da eficácia de diferentes produtos em controlar e eliminar os biofilmes dos lavatórios são muito escassas e limitadas, e mesmo que haja algum tipo de sucesso na eliminação do biofilme, em muitos casos, este não é totalmente removido e rapidamente volta a ocorrer a colonização da canalização [1,2]. Alguns dos métodos utilizados na tentativa de controlo e erradicação dos biofilmes passam pela cobertura dos lavatórios, com o intuito de limitar os salpicos de água, substituição dos lavatórios contaminados, desinfecção termal e desinfecção manual regular, apresentando uma eficácia bastante reduzida, razão pela qual a tentativa de melhorar os protocolos e procedimentos de desinfecção é necessária [2].

Existe uma clara dificuldade em estabelecer qual o método mais eficaz para controlar a formação e regeneração dos biofilmes em ambiente hospitalar, pelo que uma abordagem combinada de métodos é muitas vezes a solução utilizada pelas infraestruturas hospitalares para a tentativa de controlo e erradicação dos biofilmes. Contudo, é necessário que cada hospital efetue rastreios periódicos para avaliar a presença ou ausência de bactérias multirresistentes. Esta prática de rastreio deve ser incluída nos protocolos de desinfecção, devendo estes ser aperfeiçoados tendo em conta os casos de incidência. Os protocolos de desinfecção devem ser efetuados regularmente e para tal devem ser utilizados desinfetantes que se demonstrem eficazes na eliminação das bactérias e biofilmes com vista à tentativa de controlo das IACS [2].

1.2. *One Health*

O conceito “*One Health*” (em português “Uma Só Saúde”) é uma iniciativa que reconhece a interconexão entre a saúde humana, animal e ambiental. O objetivo da *One Health* é alcançar resultados de saúde ideais entre todos os intervenientes de forma a garantir um desenvolvimento sustentável [4].

A instituição deste termo pela Organização Mundial de Saúde (OMS) permitiu que na última década fossem gerados debates acerca da sensibilização para este tema e dos problemas associados, o que, por sua vez, levou à criação de programas de investigação,

vigilância de doenças, estudos epidemiológicos e otimização da prestação de cuidados de saúde [4].

Algumas das áreas com foco de atuação da iniciativa *One Health* incluem [4]:

- **Controle de Doenças Infeciosas** – Através da monitorização e controlo de zoonoses (doenças e infeções transmitidas ao homem pelos animais), doenças que afetam tanto humanos quanto animais e doenças transmitidas por vetores.
- **Segurança Alimentar** – Garantir a segurança dos alimentos ao longo de toda a cadeia alimentar, através da prevenção de doenças transmitidas pelos alimentos e a promoção de boas práticas agrícolas e sustentáveis.
- **Saúde Ambiental** – Avaliação dos impactos da degradação ambiental na saúde humana e animal (como por exemplo as alterações climáticas, contaminação da água, contaminação do ar e perda de biodiversidade) bem como a tentativa da sua mitigação.
- **Resistência aos Antibióticos** – Difusão do uso racional de antibióticos em humanos e animais, assim como o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com vista a reduzir a disseminação de bactérias resistentes.

1.2.1. Resistência aos Antibióticos

Após a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1928, foram descobertas, entre 1940 e 1960, uma variedade de moléculas com atividade antimicrobiana, iniciando-se a “*golden age*” da descoberta de novos antibióticos [5].

Os novos antibióticos podem ser classificados em diferentes categorias, nomeadamente tendo por base o seu mecanismo de ação [5]:

- 1- Moléculas que têm como alvo a parede celular;
- 2- Inibidores da biossíntese de proteínas;
- 3- Inibidores da replicação do ADN (ácido desoxirribonucleico);

4- Inibidores do metabolismo do ácido fólico.

Após a sua descoberta, as diferentes categorias de antibióticos começaram a ser usadas em larga escala, quer nos humanos quer na medicina veterinária, sem plena consciência das suas implicações, pois o desenvolvimento de resistência aos antibióticos por parte das bactérias foi considerado improvável, baseado na teoria de que a frequência de ocorrência de mutações capazes de gerar resistência era insignificante. Infelizmente, esta teoria viria a provar-se errada e, praticamente logo após a descoberta e utilização dos novos antibióticos, foi observado que as bactérias se conseguiam adaptar e desenvolver uma variedade de mecanismos de defesa e resistência [5].

Atualmente, a capacidade de desenvolvimento de resistência aos antibióticos por parte das bactérias é bem conhecida. Essa resistência é conferida através de mecanismos intrínsecos, como por exemplo, características funcionais, componentes estruturais ou aquisição de material genético resistente proveniente de outra bactéria por meio de conjugação, transformação ou transdução, processo conhecido como transferência horizontal de genes (HGT), que proporciona à bactéria características que impossibilitam ação do antibiótico através de bombas de efluxo, modificação da estrutura alvo e inativação por meio de enzimas [5,6].

A OMS declarou a resistência aos antibióticos como a grande ameaça do século XXI à saúde mundial. Esta encontra-se diretamente ligada entre humanos, animais e meio ambiente, fazendo com que haja necessidade de esforços interdisciplinares coordenados para o seu controlo e prevenção [6].

Alguns fatores socioeconómicos como o comércio globalizado, conflitos entre países e a migração humana/animal são importantes impulsionadores da disseminação global da resistência aos antimicrobianos. Outros fatores, como o uso inadequado de antibióticos em animais e humanos, ambientes contaminados, alterações climáticas e políticas de controlo de infeções ineficazes, também contribuem para a disseminação local e global das resistências [6].

De acordo com as recomendações da OMS, o termo “resistente a antibióticos” apenas deve ser usado para descrever bactérias, uma vez que, tanto os humanos como os próprios animais não se tornam resistentes aos antibióticos. Nos humanos, os antibióticos são usados clinicamente para tratar infeções e para fins profiláticos. No

meio veterinário, a aplicação de antibióticos diverge consoante a classe do animal, isto é, se o animal é doméstico ou para consumo. Nos animais domésticos, a prescrição de antibióticos é geralmente comparável com a prescrição nos humanos. No caso dos animais para consumo, os antibióticos são frequentemente usados como aditivos na comida e/ou água para promoverem o seu crescimento [2,5].

A resistência aos antibióticos é um componente importantíssimo do conceito *One Health*, pois nas últimas décadas, tornou-se um problema altamente preocupante para a saúde mundial e segurança alimentar. Os estudos deste tema são bastante importantes e incluem a vigilância e relato de novas resistências, estudo das dinâmicas de transmissão da resistência, conhecimento acerca das diversas bactérias resistentes e elaboração de novas abordagens terapêuticas eficazes capazes de servir como alternativa aos antibióticos. A educação da comunidade, a criação de planos nacionais de ação e a higiene/saneamento adequado das infraestruturas de saúde também são aspetos importantes dentro do conceito *One Health*, pois o objetivo é a diminuição e o controlo das bactérias resistentes [1,2].

É crucial que o uso de antibióticos seja diminuído mundialmente em todos os setores, humano, animal e agrícola, de forma a controlar o aumento de bactérias resistentes. É estimado que dois terços do consumo mundial de antibióticos venham diretamente do setor alimentar, mais propriamente, no uso de antibióticos como promotores do crescimento, devido à necessidade de aumentar a produção de animais para consumo à conta do aumento da população mundial. Como consequência, verifica-se um crescimento na disseminação de bactérias resistentes ao longo da cadeia alimentar. A excreção de bactérias resistentes pelos humanos e animais nas fezes contribui para a sua disseminação levando a que estas se acumulem nos ecossistemas com a consequente poluição das águas e dos solos [5,6].

A OMS classificou alguns dos microrganismos resistentes (Tabela 1) tendo em conta a sua relevância clínica e importância de desenvolvimento de novos antibióticos:

Tabela 1: Lista da OMS com a relevância clínica dos microrganismos e as suas resistências, bem como a prioridade para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos [5].

Espécie	Tipo de Resistência a Antimicrobianos
<i>Crítica</i>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente aos Carbapenemos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente aos Carbapenemos

<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente aos Carbapenemos, Produtora de ESBL
Alta	
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente à Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente à Meticilina e Resistência à Vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente à Claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i>	Resistente a Fluoroquinolonas
<i>Salmonellae</i>	Resistente a Fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente à Claritromicina e Fluoroquinolonas
Média	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não suscetível a Penicilinas
<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente à Ampicilina
<i>Shigella spp.</i>	Resistente a Fluoroquinolonas

Neste trabalho é dada maior preponderância a três microrganismos, ao *Staphylococcus aureus metilina resistente* (MRSA), à *Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase* (KPC) e ao *Acinetobacter baumannii*. Apenas o *Acinetobacter baumannii* é considerado crítico, no entanto, foi de interesse para a instituição a escolha destes microrganismos, uma vez que os dados epidemiológicos relativos ao ano de 2023 fornecidos pela Unidade Local do Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e Resistência aos Antimicrobianos (UL-PPCIRA) do Hospital Pêro da Covilhã identificaram estes microrganismos como microrganismos “problema” neste hospital.

1.3. *Staphylococcus aureus metilina resistente*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-Positiva oportunista em forma de cocos, imóvel e não formadora de esporos, sendo um habitante comum da flora de, aproximadamente, 30 % dos adultos saudáveis, encontrando-se presente na pele, mucosa nasal, trato urinário, trato gastrointestinal e trato respiratório [7]. Os indivíduos naturalmente colonizados com *S. aureus* têm um aumento da probabilidade de sofrerem infeções causadas por este microrganismo e, para além disso, constituem uma fonte de transmissão para outras pessoas, sendo que a transmissão ocorre muitas vezes por contacto direto (pele com pele) [9].

Este microrganismo tem a capacidade de produzir uma variedade de substâncias virulentas, tais como: diferentes tipos de proteínas, enzimas, toxinas e outras substâncias responsáveis pela sua alta patogenicidade, contribuindo para que este seja responsável por causar um largo espectro de sintomas e problemas de saúde, que variam de manifestações superficiais a fatais [7].

O facto de o *S. aureus* produzir beta-lactamases torna este microrganismo resistente à penicilina, devido à hidrólise do anel beta-lactâmico. Porém, nos anos 50, foi descoberto outro antibiótico que se demonstrou eficaz contra o *S. aureus*, a meticilina (antibiótico beta-lactâmico de pequeno espectro pertencente à família das penicilinas), que começou a ser utilizado para tratar infeções causadas por este microrganismo. Visto o *S. aureus* se demonstrar sensível à meticilina, este microrganismo passou a ser designado como *S. aureus meticilina sensível* (MSSA) [7,8].

Indo ao encontro do que aconteceu com a penicilina, o *S. aureus* também adquiriu resistência à meticilina, passando este a ser designado por MRSA para os casos onde a resistência à meticilina se verificava. A resistência à meticilina foi proporcionada pela aquisição do gene *mecA*, que codifica para a produção de PBP-2a (*penicillin binding protein*) responsável por exibir resistência contra todos os antibióticos beta-lactâmicos. A PBP-2a é uma variante da PBP-2 α , que é expressa naturalmente pelo *S. aureus* e sensível aos antibióticos beta-lactâmicos. Porém, a PBP-2a encontra-se alterada e apresenta baixa afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos. Essa baixa afinidade, em conjunto com a capacidade desta proteína catalisar a formação de ligações cruzadas entre os péptidos adjacentes nas cadeias de peptidoglicanos, confere um fortalecimento da estrutura da parede celular, o que resulta no aumento da resistência deste microrganismo a esta classe de antibióticos [7,8].

Inicialmente, as infeções por MRSA encontravam-se predominantemente associadas a ambientes hospitalares e a estruturas residenciais para idosos (ERPI). Por essa razão, este tipo de infeções foi associado à estirpe HA-MRSA (“*Healthcare associated MRSA*”, em português “MRSA associado a infraestruturas de saúde”). No entanto, nos finais dos anos 90 do século passado, começaram a aparecer casos de infeção por MRSA em pessoas da comunidade que não tiveram contacto recente com ambiente hospitalar ou contacto com pessoas recentemente internadas. Estas infeções foram então associadas à estirpe CA-MRSA (“*Community-associated MRSA*”, em português “MRSA associado à comunidade”). Uma das diferenças entre as estirpes HA-MRSA e CA-MRSA, é que a estirpe HA-MRSA possui um maior número de resistências a antibióticos, enquanto a estirpe CA-MRSA apresenta menor número. Este facto contribui para que as infeções associadas à estirpe HA-MRSA sejam muito mais prejudiciais para a saúde humana do que as infeções associadas à estirpe CA-MRSA. Mais recentemente, foi identificado em vários países MRSA em animais domésticos e para consumo. Uma característica desta estirpe é o facto de não causar infeções no hospedeiro animal, porém, já foram reportados casos de infeções provocadas por esta estirpe em pessoas que diariamente

interagem com animais colonizados. Este tipo de infecções foi associado à estirpe LA-MRSA (“*Livestock associated MRSA*”, em português “MRSA associado a animais”). O aparecimento desta estirpe está associado ao uso indiscriminado de antibióticos na produção animal, na atividade agrícola e na medicina veterinária [9].

A transmissão de MRSA pode ocorrer de duas maneiras, sendo que uma delas é através da transmissão direta de clones de MRSA entre humanos, entre animais, de animais para humanos e de humanos para animais. A outra forma é através a aquisição do SSCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que corresponde a uma região genômica móvel que contem o gene *mecA*, sendo que essa aquisição pode ocorrer através da transferência horizontal de genes entre diferentes espécies de microrganismos ou dentro da mesma espécie. Por exemplo, um MRSA pode transferir o SSCmec para um MSSA fazendo com que este adquira a resistência à metilina e se transforme num MRSA [7].

Para além da resistência à metilina, nos últimos anos, também se tem verificado o aumento do número de estirpes de MRSA resistentes à vancomicina. Este facto despertou a preocupação dentro da comunidade científica e clínica, visto a vancomicina ser frequentemente usada para tratar infecções graves por MRSA, especialmente nos casos onde os outros antibióticos se demonstraram ineficazes. A vancomicina interfere na síntese da parede celular bacteriana através da ligação a precursores dos peptidoglicanos inibindo a sua transpeptidação. Como resultado as bactérias são incapazes de manter a sua integridade estrutural e acabam por sofrer lise celular, ocorrendo a sua morte. O surgimento de *S. aureus vancomicina resistente* (VRSA) ocorre devido à aquisição do gene *vanA*, que é responsável por conferir a resistência à ação deste antibiótico através da síntese de peptidoglicanos com precursores alterados e cuja afinidade para a vancomicina é baixa. Isto significa que mesmo na presença de vancomicina estas bactérias conseguem manter a sua integridade e sobreviver. O desenvolvimento desta resistência tende a aparecer após períodos de tratamento prolongados com vancomicina ou de tratamentos repetidos com vancomicina para tratar outro tipo de infecção [9].

A capacidade deste microrganismo se adaptar aos diferentes hospedeiros, às diferentes condições ambientais e às diferentes condições de tratamento, constitui um fator bastante preocupante e que justifica a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens para tratar infecções provocadas por MRSA, da mesma forma que protocolos de desinfeção eficientes em ambientes hospitalares e ERPI devem ser

desenvolvidos, com vista a diminuir as infeções provocadas por este microrganismo [8].

1.4. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases

A *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC) é uma bactéria Gram-Negativa em forma de bacilo pertencente à família das ERC. Este tipo de bactérias é resistente contra a grande maioria dos antibióticos disponíveis atualmente, tornando bastante difícil a escolha do antibiótico a usar [10].

As ERC são responsáveis mundialmente pelo aumento do número de IACS nos últimos anos e, particularmente, a KPC representa o tipo de bactéria Gram-Negativa produtora de carbapenemases mais comum de ser transmitida em ambiente hospitalar e em ERPI, sendo capaz de originar pneumonia nos doentes colonizados [12]. As carbapenemases produzidas pelas KPC pertencem à classe A das beta-lactamases (serina beta-lactamase). Estas têm uma capacidade hidrolítica bastante forte sendo capazes de destruir o anel beta-lactâmico dos carbapenemos [10,11]. Os carbapenemos são uma classe de antibióticos beta-lactâmicos utilizados para tratar infeções bacterianas graves, sendo muitas vezes considerados a última linha de defesa contra infeções por microrganismos resistentes a outros antibióticos. O anel beta-lactâmico, presente neste tipo de antibiótico, é fundamental para a sua atividade antibacteriana, pois este interfere na síntese da parede celular bacteriana, tornando-a mais fraca e, conseqüentemente, levando à morte. As carbapenemases produzidas pela KPC são codificadas pelo gene bla_{KPC} e interferem com o anel beta-lactâmico através da alteração da sua estrutura por meio de hidrólise, inativando a ação dos carbapenemos [10,11].

A KPC foi identificada pela primeira vez em 1996 na zona norte dos Estados Unidos da América, porém, atualmente é a ERC mais disseminada mundialmente. Fatores como o uso indiscriminado e excessivo de carbapenemos em hospitais, HGT, mobilidade global de pessoas e mercadorias, práticas de controlo de infeções pouco eficazes, superlotação hospitalar e uso de dispositivos invasivos contribuíram para a disseminação global da KPC e justificam esta ser a bactéria Gram-Negativa mais propícia a ser transmitida em ambiente hospitalar [10]. Para além disso, diferentes estirpes de KPC já foram encontradas em ambiente doméstico, aquático, agricultura e animais selvagens, demonstrando a alta capacidade da KPC se difundir pelo meio ambiente [11].

Os estudos *in vitro* da combinação ceftazidima-avibactam contra a KPC demonstraram excelentes resultados, levando à diminuição da taxa de mortalidade no grupo de doentes tratados com a mesma [11]. O avibactam inibe reversivelmente as beta-lactamases alvo. Por outro lado, a ceftazidima atua de forma similar às penicilinas e carbapenemos, através da inibição da síntese da parede celular bacteriana. Porém, sendo também um beta-lactâmico, a sua ação é bloqueada pelas beta-lactamases produzidas pela KPC, pelo que a combinação destes dois antibióticos se demonstrou bastante promissor pois, através de um processo contínuo de inibição das beta-lactamases alvo e regeneração do avibactam a ceftazidima pode levar à morte da célula bacteriana. No entanto, a comercialização/utilização mundial deste novo inibidor levaram a que a KPC sofresse mutações adaptativas através da alteração da estrutura da beta-lactamase alvo e, conseqüentemente, foram geradas novas estirpes de KPC. A alteração da estrutura da beta-lactamase alvo diminuiu a capacidade do avibactam se ligar à mesma e realizar a sua ação inibitória. Interessantemente, foi verificado que algumas destas novas variantes voltaram a ganhar suscetibilidade aos carbapenemos, principalmente ao imipenem e ao meropenem. Esta característica permitiu que os carbapenemos pudessem ser usados nestes casos em específico, usando-se maiores dosagens e maiores tempos de infusão dos mesmos. Apesar de tudo, na grande parte destes casos, aquando do tratamento com imipenem ou meropenem isolados ou em combinação com outros antibióticos, estas estirpes voltam a sofrer mutações que lhes conferem novamente a resistência inicial aos carbapenemos [10,11].

Desde 2019, os casos reportados de novas estirpes de KPC supera a soma de todos os casos reportados nos últimos 17 anos. Esta capacidade adaptativa da KPC às diferentes condições de tratamento demonstra a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tratar as infeções causadas por KPC, da mesma forma que protocolos de desinfeção e erradicação eficientes em ambientes hospitalares e ERPI devem ser desenvolvidos, com o objetivo de diminuir as IACS e a mortalidade associada a este microrganismo [10].

1.5. *Acinetobacter baumannii*

O *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria Gram-Negativa não flagelada em forma de cocobacilo e é bastante oportunista [13,14]. Este microrganismo é responsável por causar uma vasta variedade de infeções nosocomiais e o facto de poder adquirir resistência contra praticamente todos os antibióticos utilizados clinicamente, inclusive, contra os antibióticos utilizados na última linha de defesa como é o caso da colistina,

tigeciclina e carbapenemos, torna este microrganismo bastante perigoso para a saúde pública [14,15].

O *A. baumannii* apresenta vários mecanismos de defesa contra a ação dos antibióticos, sendo que a nível genético, os isolados de *A. baumannii* apresentam uma elevada heterogeneidade, contribuindo para a ideia de que este é um microrganismo bastante complexo e que representa um desafio para a saúde pública e para a comunidade científica [15]. Uma das estratégias de resistência é a modificação da estrutura da molécula alvo, fazendo com que o antibiótico seja incapaz de a reconhecer. Outra estratégia é a inativação do antibiótico através da produção de enzimas que o inativam antes deste exercer o seu efeito, ou ainda a redução da concentração intracelular do antibiótico através de bombas de efluxo que expõem o antibiótico do interior da célula para o exterior. E, por último, é capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular impedindo a penetração do antibiótico. Para além destes mecanismos de defesa, o *A. baumannii* também pode adquirir genes que lhe conferem resistência a antibióticos através de HGT onde por meio de conjugação, com outras bactérias resistentes, adquire elementos genéticos móveis que conferem resistência [16].

O *A. baumannii* foi colocado na categoria “ESKAPE” e fazem parte dessa categoria microrganismos com várias resistências a antibióticos tais como o *Enterococcus faecium*, o *Staphylococcus aureus*, a *Klebsiella pneumoniae*, a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Enterobacter spp.*, tendo o *A. baumannii* sido classificado pela OMS como o mais problemático dentro desta categoria e uma prioridade dentro da comunidade científica para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos ou de alternativas terapêuticas eficazes para tratar as infeções causadas por este microrganismo [13,15].

Os primeiros casos de infeções causadas por este microrganismo foram reportados nos Estados Unidos da América no início dos anos 2000, em soldados que cumpriram serviço militar no Iraque e Afeganistão, inclusive, este microrganismo chegou a ter a alcunha de “Iraqibacter”. Atualmente, o *A. baumannii* multirresistente já se encontra espalhado por todo o globo com exceção da Antártica, onde até agora, nenhum caso foi reportado [13].

A manifestação clínica predominante causada pelo *A. baumannii* é o desenvolvimento de pneumonia em doentes ventilados, no entanto, também é capaz de levar ao desenvolvimento de infeções sanguíneas e no trato urinário, sendo também responsável

por originar meningites [13,15]. Devido à vasta resistência aos antibióticos, as infecções causadas por este microrganismo estão associadas a um mau prognóstico [13].

Uma das principais propriedades do *A. baumannii* é a sua capacidade de gerar biofilmes, característica que lhe permite sobreviver e persistir nas configurações hospitalares. De facto, os biofilmes conferem ao *A. baumannii* resistência contra a dissecação, isto é, permite a sobrevivência por longos períodos em condições desfavoráveis como é o caso de falta de humidade e até secura total, permitindo a sua instalação em todo o tipo de superfícies. Outra propriedade conferida pelos biofilmes é a resistência aos desinfetantes, substâncias essas que em condições normais eram capazes de exterminar este microrganismo [13-15].

Para que o *A. baumannii* seja capaz de colonizar, tem de existir primeiro o contacto com uma superfície hospedeira, podendo ela ser biótica ou abiótica. Após o primeiro contacto, é estabelecido a aderência do microrganismo à superfície hospedeira e só depois é que são expressos os fatores virulentos que permitem a colonização e formação do biofilme. Este processo de formação do biofilme é bastante regulado e começa com as bactérias a formarem estruturas terciárias que permitem que cada uma das células estejam bastante próximas umas das outras, de modo a facilitar o contacto entre elas. Após essa aproximação é formada uma matriz de carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas, que permitem ao *A. baumannii* sobreviver em condições desfavoráveis [13-15]. O gene *bap* desempenha um papel bastante importante na formação do biofilme, uma vez que codifica proteínas responsáveis pela adesão intercelular. Outro gene envolvido na formação do biofilme é o gene *OmpA*, que codifica para a proteína membrana externa A, que é responsável pela adesão e desenvolvimento de um biofilme robusto [14].

A capacidade de formação de biofilmes e a consequente resistência às tentativas de eliminação do mesmo contribuem para que o *A. baumannii* esteja fortemente associado a IACS, podendo os biofilmes se encontrar presentes numa vasta lista de material hospitalar, como é o caso de tubos respiratórios, tubos de diálise, aço inoxidável, superfícies de policarbonato, tubagens de canalização, entre outros. Para além disso, a multirresistência, quer aos desinfetantes, quer aos antibióticos, contribui para que este microrganismo seja considerado pela OMS uma ameaça crítica para a saúde pública. Assim, é necessário o desenvolvimento de novos antibióticos e/ou outras abordagens terapêuticas eficazes que permitam melhorar o prognóstico dos doentes

infetados, bem como protocolos de desinfecção eficazes para diminuir o risco de um surto de *A. baumannii* numa infraestrutura de saúde [13-15].

1.6. Agentes Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas utilizadas para matar ou inibir o crescimento de microrganismos, com vista à prevenção de infeções, tratamento de doenças e controlo da propagação. Estes podem ser classificados com base no tipo de microrganismo que afetam e no seu local de aplicação, dentro dessa classificação temos [45]:

- **Agentes Antissépticos:** Utilizados para prevenir infeções em tecidos vivos;
- **Agentes Desinfetantes:** Utilizados para inativar/destruir microrganismos em superfícies inanimadas;
- **Antibióticos:** Medicamentos utilizados para matar microrganismos patogénicos;
- **Antivirais:** Medicamentos que inibem a replicação de vírus;
- **Antifúngicos:** Substâncias que impedem/destroem o crescimento de fungos;
- **Antiparasitários:** Medicamentos que combatem parasitas.

Atualmente existe uma variedade de agentes antimicrobianos utilizados para desinfetar e esterilizar as infraestruturas de saúde, entre eles, hipoclorito de sódio (lixívia), peróxido de hidrogénio, álcool (etanol e isopropanol), compostos fenólicos, ácido peracético e dicloroisocianurato de sódio [17]. Neste trabalho, foram comparados dois agentes desinfetantes à base de dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) que após serem dissolvidos em água libertam ácido hipoclorídrico (HOCl) e iões hipoclorito (OCl⁻) responsáveis por atuar sobre os microrganismos. Os agentes estudados foram o *Klorkleen Plus (Imporquímica®)* e o *Granulado Desinfetante Efervescente (Agadesinfect®)* [17-19].

A escolha dos agentes desinfetantes a usar neste trabalho foi efetuada pela UL-PPCIRA do Hospital Pêro da Covilhã, sendo este o gabinete responsável pelo controlo da infeção hospitalar.

2. Objetivos do Projeto de Investigação

A resistência aos antibióticos é um problema grave cujo número de casos reportados tem aumentado severamente nas últimas décadas, razão pela qual a OMS a considerou como a principal ameaça do século XXI à saúde pública. As bactérias multirresistentes são responsáveis por causar infeções graves, muitas vezes intratáveis, uma vez que devido às múltiplas resistências aos antibióticos torna-se bastante difícil para o clínico escolher que antibiótico usar, o que justifica o mau prognóstico associado a estas infeções [3].

A capacidade de formação de biofilmes por parte destas bactérias e a sua resistência às tentativas de eliminação permitem que estes se possam encontrar presentes na canalização hospitalar. Por esta razão, os lavatórios foram identificados como possíveis fontes de transmissão aos doentes hospitalizados que se encontrem a menos de 1 metro de distância, contribuindo para o aumento do número de IACS nos últimos anos [14,15].

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de três microrganismos multirresistentes nos ralos dos lavatórios de três serviços do Hospital Pêro da Covilhã, sendo testada, em simultâneo, a eficácia de dois desinfetantes na eliminação dos biofilmes, caso se verificasse a sua presença, durante um período de 4 semanas. A escolha do local e os microrganismos multirresistentes a pesquisar teve por base os dados epidemiológicos relativos ao ano de 2023 fornecidos pela UL-PPCIRA do Hospital Pêro da Covilhã.

3. Material e Métodos

3.1. Seleção de amostras

Com base nos dados epidemiológicos de 2023 da UL-PPCIRA, foram selecionados os locais de colheita e os microrganismos a pesquisar. No ano de 2023 foram contabilizadas no total 417 IACS, dais quais 63 (15,1 %) foram provenientes do serviço de medicina I, 44 (10,6 %) do serviço de medicina II e 47 (11,3 %) da Unidade de Cuidados Intensivos (UCI). Relativamente aos microrganismos multirresistentes causadores destas infeções, no ano de 2023 foram contabilizadas 14 infeções causadas por *Acinetobacter baumannii*, 23 por MRSA e 20 por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Nos serviços de medicina I e medicina II foram escolhidos 22 lavatórios (11 em cada serviço) e 2 lavatórios na UCI, perfazendo um total de 24 lavatórios. Em todos os lavatórios, foi efetuada a pesquisa de *Acinetobacter baumannii*, MRSA e KPC na sua canalização e avaliada a eficácia de dois desinfetantes na eliminação do biofilme. A desinfecção foi efetuada duas vezes por dia pelos assistentes operacionais de cada serviço durante as 4 semanas de estudo, sendo o *Klorbleen Plus* utilizado como desinfetante de estudo na UCI e no serviço de medicina I, enquanto o *Granulado Desinfetante Efervescente* foi utilizado no serviço de medicina II. Apesar dos desinfetantes terem o mesmo princípio ativo, estes tinham modos de utilização e preparação diferentes. O *Klorbleen Plus* era preparado através da dissolução de 4 pastilhas de 1,7 g de NaDCC em 1 litro de água para criar uma solução com 4000 ppm, equivalente a 4 g de princípio ativo por litro, sendo esta aplicada diretamente na canalização do lavatório e após 15 minutos de atuação era efetuada uma descarga de água. Por sua vez, o *Granulado Desinfetante Efervescente* era aplicado diretamente na canalização do lavatório na sua forma de pó/sal através de uma dosagem de cerca de 20 cm³, equivalente a 22 g de princípio ativo, após 15 minutos de atuação era efetuada uma descarga de água que provocava a sua efervescência e libertação do princípio ativo.

As amostras para o estudo foram todas recolhidas pela mesma pessoa no âmbito deste projeto no início de cada semana, com recurso a zaragatoas estéreis. Em cada lavatório foi introduzida uma zaragatoa na sua canalização fazendo movimentos giratórios durante cerca de 30 segundos, certificando-se que a zaragatoa tocava nas paredes internas da canalização. Em cada lavatório foram recolhidas duas zaragatoas, equivalente a duas amostras diferentes, sendo uma relativa à amostra antes da desinfecção e outra relativa à amostra após a desinfecção com o desinfetante em estudo.

É de salientar que a recolha da 2^a zaragatoa era efetuada após 15 minutos de atuação do desinfetante. Após a recolha das zaragatoas, estas eram enviadas imediatamente para o laboratório de microbiologia, sendo necessário a identificação com o local da recolha, número do lavatório e se a recolha foi efetuada antes ou depois da desinfeção

A recolha de dados teve início no dia 22 de janeiro de 2024 e terminou a 15 de abril do mesmo ano. Durante esse período, foram recolhidas no total 190 amostras, sendo 14 provenientes da UCI, 88 do serviço de medicina I e 88 do serviço de medicina II. A partir dessas amostras foram gerados 570 resultados.

3.2. Processamento das amostras

Após a chegada das amostras ao laboratório, e caso tudo estivesse em conformidade, cada zaragatoa era inserida num caldo de carne, meio de enriquecimento composto por uma variedade de nutrientes e outros compostos que permitem o crescimento de uma grande variedade de bactérias. Estes caldos de carne foram incubados a 35° C durante 24 horas. Após as 24 horas de incubação foi efetuada a passagem do caldo de carne para os meios sólidos gelose MRSA (*BioMérieux*), gelose CARB/OXA (*BioMérieux*) e gelose MacConkey (*BioMérieux*), que foram incubados a 35° C durante um período de 24 horas. Após as 24 horas de incubação foi avaliado o crescimento dos microrganismos em estudo em cada meio e, caso não houvesse crescimento os meios eram incubados mais 24 horas. Uma vez que se utilizaram meios cromogéneos, o aparecimento de colónias com uma morfologia verde no meio MRSA (Figura 1A) confirmava a presença de MRSA, e o aparecimento de colónias com morfologia verde-escura/azul no meio CARB/OXA (Figura 1B) confirmava a presença de KPC. Para a pesquisa do *Acinetobacter baumannii* não foi utilizado um meio cromogéneo, tendo sido utilizado a gelose MacConkey, e atendendo as características morfológicas das colónias de *A. Baumannii*, caso se verificasse o aparecimento de colónias lactose negativa (Figura 1C) estas eram identificadas baseadas nas suas características bioquímicas pelo equipamento VITEK®2 COMPACT (*BioMérieux*).



Figura 1: Visualização do crescimento dos microrganismos. (A) – MRSA (colónias verdes), (B) – KPC (colónias verde-escuras/azul), (C) – *A. Baumannii* (colónias lactose negativas)

4. Resultados

No total foram analisadas 190 amostras, 95 correspondentes a amostras antes da desinfecção e 95 correspondentes a amostras após a desinfecção. A partir dessas amostras foram obtidos 570 resultados, dos quais 48 (8,4 %) foram positivos para os microrganismos em estudo.

4.1. Unidade de Cuidados Intensivos

Foram recolhidas no total 14 amostras (6 antes da desinfecção e 8 após a desinfecção), provenientes dos 2 lavatórios em estudo neste local, resultando na obtenção de 42 resultados (Tabelas 2-4). Na quarta semana não há resultados antes da desinfecção, por não ter sido possível obter as amostras.

Tabela 2: Caracterização dos resultados da pesquisa de MRSA na UCI.

MRSA	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Lavatório 1	-	-	-	-	-	-	X	-
Lavatório 2	-	-	-	-	-	-	X	-
(%) Positivos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 3: Caracterização dos resultados da pesquisa de KPC na UCI.

KPC	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Lavatório 1	-	-	-	-	-	-	X	-
Lavatório 2	-	-	-	-	-	-	X	-
(%) Positivos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 4: Caracterização dos resultados da pesquisa de *Acinetobacter baumannii* na UCI.

<i>A.baumannii</i>	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Lavatório 1	-	-	-	-	-	-	X	-
Lavatório 2	-	-	-	-	-	-	X	-
(%) Positivos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

4.2. Serviço de medicina I

Foram recolhidas no total 88 amostras (44 antes da desinfecção e 44 após a desinfecção), provenientes dos 11 lavatórios em estudo neste local, resultando na obtenção de 264 resultados (Tabelas 5-7).

Tabela 5: Caracterização dos resultados da pesquisa de MRSA no serviço de medicina I.

MRSA	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Enf.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.2	+	-	+	-	+	+	+	-
Enf.3	+	-	+	-	-	-	+	-
Enf.4	+	+	-	-	+	+	+	-
Enf.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.7	-	-	+	-	-	-	+	-
S.Medicção	+	-	+	-	+	+	+	-
S.Pensos	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 29	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 30	-	-	-	-	-	-	-	-
(%) Positivos	36,4	9,1	36,4	0,0	27,3	27,3	45,5	0,0

Tabela 6: Caracterização dos resultados da pesquisa de KPC no serviço de medicina I.

KPC	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Enf.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.2	+	-	+	-	+	+	+	-
Enf.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.4	+	+	+	-	+	+	+	-
Enf.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.7	-	-	+	-	-	-	+	-
S.Medicção	+	-	+	-	+	+	+	-
S.Pensos	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 29	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 30	-	-	-	-	-	-	-	-
(%) Positivos	27,3	9,1	36,4	0,0	27,3	27,3	36,4	0,0

Tabela 7: Caracterização dos resultados da pesquisa de *Acinetobacter baumannii* no serviço de medicina I.

<i>A.baumannii</i>	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Enf.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.7	-	-	-	-	-	-	-	-

S.Medicaco	-	-	-	-	-	-	-	-
S.Pensos	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 29	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 30	-	-	-	-	-	-	-	-
(%) Positivos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

4.3. Servio de medicina II

Foram recolhidas no total 88 amostras (44 antes da desinfeo e 44 aps a desinfeo), provenientes dos 11 lavatrios em estudo neste local, resultando na obteno de 264 resultados (Tabelas 8-10).

Tabela 8: Caracterizao dos resultados da pesquisa de MRSA no servio de medicina II.

MRSA	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Aps	Antes	Aps	Antes	Aps	Antes	Aps
Enf.1	+	-	-	-	-	-	-	-
Enf.2	+	-	-	-	-	-	-	-
Enf.3	+	+	-	-	-	-	-	-
Enf.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.7	+	-	-	-	-	-	-	-
S.Medicaco	-	-	-	-	-	-	-	-
S.Pensos	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 29	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 30	-	-	-	-	-	-	-	-
(%) Positivos	36,4	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 9: Caracterizao dos resultados da pesquisa de KPC no servio de medicina II.

KPC	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Aps	Antes	Aps	Antes	Aps	Antes	Aps
Enf.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.2	+	-	-	-	-	-	-	-
Enf.3	+	+	-	-	-	-	-	-
Enf.4	+	-	-	-	-	-	-	-
Enf.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.7	-	-	-	-	-	-	-	-
S.Medicaco	+	-	-	-	-	-	-	-
S.Pensos	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 29	-	-	-	-	-	-	-	-

Adufa 30	-	-	-	-	-	-	-	-
(%) Positivos	36,4	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 10: Caracterização dos resultados da pesquisa de *Acinetobacter baumannii* no serviço de medicina II.

A.baumannii	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Enf.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.7	-	-	-	-	-	-	-	-
S.Medicção	-	-	-	-	-	-	-	-
S.Pensos	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 29	-	-	-	-	-	-	-	-
Adufa 30	-	-	-	-	-	-	-	-
(%) Positivos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

5. Discussão de Resultados

Dos 570 resultados obtidos, 48 (8,4 %) foram positivos para a pesquisa dos microrganismos em estudo, sendo 25 (4,4 %) positivos para MRSA e 23 (4,0 %) positivos para KPC. Relativamente ao *Acinetobacter baumannii*, não foi registado qualquer caso positivo ao longo das semanas de estudo.

Na UCI, ao longo das 4 semanas, não foram identificados nos ralos dos lavatórios os microrganismos em estudo. Este facto foi sustentado pela ausência de crescimento de colónias dos três microrganismos nos respetivos meios sólidos utilizados (Tabelas 2-4). Com base na bibliografia, a ausência destes três microrganismos multirresistentes nos ralos dos lavatórios deste serviço é indicador de um bom prognóstico no que toca à ausência de possíveis IACS.

Relativamente aos resultados obtidos no serviço de medicina I, e através da análise da Tabela 5, podemos observar que ao longo das 4 semanas de estudo foram obtidos 20 resultados positivos para MRSA, tendo a maior parte dos resultados positivos vindo dos lavatórios das enfermarias número 2, 4 e sala da medicação. Analisando a Tabela 6, podemos ver que, ao longo das 4 semanas de estudo, foram obtidos 18 resultados positivos para KPC, tendo a maior parte desses resultados vindo dos lavatórios das enfermarias número 2, 4 e sala de medicação. Estes resultados vão ao encontro dos resultados obtidos na Tabela 5, tendo as mesmas enfermarias mantido a presença destes dois microrganismos ao longo das 4 semanas de estudo. Possivelmente estes dados demonstram a existência de um biofilme composto por esses microrganismos. Esta situação é bastante crítica, pois a exposição a estes microrganismos pode levar ao desenvolvimento de infeções nos doentes hospitalizados nas duas enfermarias, da mesma forma que os utilizadores da sala onde é efetuada a preparação da medicação também estão expostos a estes microrganismos aquando da utilização do lavatório. Em relação ao *Acinetobacter baumannii*, podemos verificar pela Tabela 7 que ao longo das 4 semanas de estudo não foi obtido qualquer resultado positivo.

Relativamente aos resultados obtidos no serviço de medicina II, e através da análise da Tabela 8, podemos observar que na primeira semana foram registados 5 resultados positivos para MRSA, e pela análise da Tabela 9 na mesma semana foram também registados 5 resultados positivos para KPC. Porém, se analisarmos os resultados das restantes semanas verificamos que a partir da segunda semana não foram identificados mais microrganismos nos lavatórios das enfermarias, da mesma forma, os lavatórios onde não foram identificados microrganismos na primeira semana mantiveram-se

negativos ao longo das semanas restantes. O facto de terem sido obtidos resultados positivos para MRSA e KPC na primeira semana, mais propriamente 8 antes da primeira desinfeção e 2 após a primeira desinfeção, pressupõem que estes lavatórios devem estar colonizados por estes dois microrganismos. Nas restantes semanas, nos lavatórios inicialmente colonizados não foram identificados mais microrganismos e os lavatórios negativos mantiveram-se negativos demonstrando a eficácia do desinfetante usado neste local na eliminação do biofilme presente e a sua eficácia contra a regeneração do mesmo. Pela análise da Tabela 10 podemos ver que nenhum resultado positivo para *Acinetobacter baumannii* foi obtido ao longo das 4 semanas de estudo no serviço de medicina II, resultado este que vai ao encontro dos resultados obtidos na UCI e no serviço de medicina I, demonstrando que dos 24 lavatórios estudados nenhum se encontra colonizado com *Acinetobacter baumannii*.

Como referido no tópico 3.2, devido à utilização do meio gelose MacConkey para a identificação de *Acinetobacter baumannii*, aquando do crescimento de colónias lactose negativas, que são características do *Acinetobacter baumannii*, estas eram identificadas tendo em conta as suas características bioquímicas pelo equipamento VITEK®2 COMPACT. No total foram feitas seis identificações neste equipamento para confirmar ou refutar a presença de *Acinetobacter baumannii*, sendo que nenhuma das identificações confirmou a presença deste microrganismo. Foram identificadas a partir das seis colónias suspeitas: três colónias de *Pseudomonas aeruginosa*, uma colónia de *Enterobacter cloacae*, uma colónia de *Burkholderia cepacia* e uma colónia de *Cupriavidus pauculus*.

Através da análise comparativa dos dois desinfetantes usados na eliminação do biofilme foi possível observar que estes possuem eficácias diferentes. Analisando os dados referentes à UCI, podemos observar que o crescimento dos três microrganismos em estudo foi nulo ao longo das 4 semanas, a utilização de *Klorkleen Plus* neste local foi eficaz no controlo da formação de possíveis biofilmes, porém, nada nos diz acerca da sua capacidade de eliminação do biofilme. Contudo, se analisarmos os dados referentes ao serviço de medicina I, serviço onde também foi usado *Klorkleen Plus* como desinfetante, podemos constatar que a capacidade de eliminação do biofilme por este desinfetante não é muito eficaz. Este dado é facilmente confirmado pelo facto da percentagem de lavatórios positivos se manter ao longo das 4 semanas de estudo, inclusive, analisando as Tabelas 5 e 6, é possível verificar que a percentagem de lavatórios positivos no caso do MRSA aumenta de 36,4 % na primeira semana para 45,5 % na quarta semana, e no caso da KPC aumenta de 27,3 % para 36,4 %. Estes dados

revelam a falta de capacidade deste desinfetante em eliminar o biofilme sendo também pouco eficaz na prevenção da recolonização. Se analisarmos os dados referentes à primeira semana podemos observar que a percentagem de lavatórios positivos antes da desinfecção era de 36,4 % e após a desinfecção a percentagem era de 9,1 % (Tabela 5), demonstrando que o *Klorkleen Plus* tem alguma capacidade de atuação sobre o biofilme após 15 minutos, porém se analisarmos a percentagem de lavatórios positivos antes da desinfecção na segunda semana vemos que esta volta a ser 36,4 %, sendo visível que o MRSA recolonizou praticamente todos os lavatórios positivos na primeira semana, e que também colonizou outro lavatório que era negativo. Ao analisarmos os dados das restantes semanas vemos que o crescimento de MRSA é praticamente constante o que vai ao encontro da falta de eficácia do *Klorkleen Plus* em eliminar por completo o biofilme. A Tabela 6 é semelhante à Tabela 5, o que comprova que o *Klorkleen Plus*, apresenta uma baixa eficácia na eliminação do biofilme e na contenção da sua regeneração.

Contudo, analisando os dados referentes ao serviço de medicina II, onde foi utilizado o *Granulado Desinfetante Efervescente*, podemos ver que, apesar do princípio ativo ser o mesmo, os resultados foram completamente diferentes. Ao analisarmos as Tabelas 8 e 9, respetivamente, é possível observar que antes da primeira desinfecção foram detetados 4 lavatórios positivos (36,4%) para MRSA e KPC, resultados estes que eram espectáveis pois o estudo no serviço de medicina II foi realizado após o estudo no serviço de medicina I estar concluído, pelo que também era expectável encontrar lavatórios colonizados por estes dois microrganismos neste serviço. Porém, ao contrário dos resultados do serviço de medicina I, vemos que a percentagem de lavatórios positivos passou a 0,0 % na segunda semana, tendo-se mantido esta percentagem até ao final do estudo. Estes dados revelam que o *Granulado Desinfetante Efervescente* tem uma capacidade de eliminação do biofilme bastante superior à do *Klorkleen Plus*.

Existem algumas propriedades do Granulado que podem justificar a diferença de eficácia em relação ao *Klorkleen Plus*, sendo que uma delas é a concentração do princípio ativo ser bastante superior à verificada no *Klorkleen Plus*. Outro fator que pode ter influenciado a eficácia dos desinfetantes foram os modos de utilização de cada um. O facto de o Granulado ser administrado na forma de pó/sal pode levar a uma maior agressão e penetração no biofilme, que após a descarga de água e devido às suas propriedades efervescentes provoca ainda mais danos, resultando na eliminação do biofilme. Por outro lado, o *Klorkleen Plus* é utilizado como uma solução aquosa tendo

um menor tempo de atuação sobre o biofilme resultando numa capacidade de agressão mais reduzida. Outra propriedade do Granulado é este ser composto por NaDCC e outros detergentes, enquanto o Klorkleen Plus é apenas composto por NaDCC. Esta diferença na composição pode ser outro dos fatores que justificam a maior eficácia de um sobre o outro.

É de salientar que várias questões podem ser colocadas em relação aos dados da desinfecção que foram obtidos, pois este processo foi realizado duas vezes ao dia durante as 4 semanas de estudo e envolveu um elevado número de assistentes operacionais a realizar estes procedimentos. Por esta razão, não é garantido que a desinfecção tenha ocorrido de igual forma nos diferentes serviços e que não tenham existido interferentes na sua realização. Um dos parâmetros chave era a não utilização dos lavatórios durante os 15 minutos de atuação do desinfetante, sendo que o controlo da não utilização dos lavatórios durante esse período é bastante difícil, devido ao elevado número de intervenientes. Por exemplo, analisando os dados da terceira semana da Tabela 5 e Tabela 6, podemos ver que a percentagem de lavatórios positivos para MRSA e KPC é a mesma antes e depois da desinfecção, deixando assim dúvidas acerca se a primeira desinfecção diária foi ou não realizada nesse local e se após a desinfecção foram ou não aguardados os 15 minutos de atuação do desinfetante, o que pode ter comprometido os resultados relativos a essa semana.

A bibliografia sobre a eficácia de agentes desinfetantes à base de NaDCC é escassa [2,3,143,144]. No entanto, os resultados obtidos neste estudo vão de encontro aos estudos consultados, e que o NaDCC em formato de pastilha apresenta uma menor eficácia contra o biofilme e o NaDCC em formato de Grânulos uma maior eficácia. No futuro, este estudo devia ser alargado para um período superior a 4 semanas, assim como deveria ser feita a contagem das Unidades Formadoras de Colónias (UFC) e comparados os seus valores ao longo das semanas de estudo com o objetivo de uma melhor avaliação do desempenho destes dois desinfetantes.

Este estudo apresenta algumas limitações, sendo que uma delas é a não caracterização total dos microrganismos multirresistentes presentes na canalização dos lavatórios. O facto deste estudo ser apenas restrito à pesquisa de MRSA, KPC e *Acinetobacter baumannii*, microrganismos multirresistentes com maior incidência no ano de 2023 nesta unidade hospitalar, não é totalmente indicativo do real problema com que o hospital está a lidar em termos de microrganismos multirresistentes presentes na canalização dos lavatórios. Outra limitação é o facto de, aquando da visualização do

crescimento dos microrganismos nos diferentes meios sólidos utilizados, não ser efetuada contagem das UFC. A contagem das UFC iria permitir realizar uma análise mais objetiva da eficácia dos dois desinfetantes comparados. Neste presente estudo foi verificado que para a eliminação e contenção da formação de biofilmes o *Granulado Desinfetante Efervescente* tem eficácia superior quando comparado com o *Klorkleen Plus*, facto justificado pela completa ausência de crescimento dos microrganismos nas semanas após a primeira semana de desinfeção com o *Granulado*, no caso do *Klorkleen Plus* este facto não foi verificado, pois ao longo das semanas de estudo foi visível o crescimento dos microrganismos em estudo, porém a conclusão tirada pela observação dos dados do *Klorkleen Plus* poderia ser outra caso tivesse sido efetuado contagem das UFC e comparada essa contagem ao longo das semanas de estudo.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

A presença de biofilmes na canalização hospitalar demonstrou ser nos últimos anos uma das razões que contribui para o aumento do número de infeções nosocomiais por microrganismos multirresistentes, razão pela qual as infraestruturas de saúde devem exercer medidas de prevenção para combater este tipo de infeções.

Com este estudo foi nos possível averiguar que o MRSA e a KPC se encontravam presentes em alguns ralos dos lavatórios dos serviços de medicina I e medicina II, não se encontrando presentes nos ralos dos lavatórios da UCI. Em relação ao *Acinetobacter baumannii* foi possível constatar que nenhum dos 24 lavatórios estudados se encontrava colonizado por este microrganismo.

Considerando os dados da eficácia dos desinfetantes foi possível concluir que o *Granulado Desinfetante Efervescente (Agadesinfect®)* apresenta maior eficácia na eliminação do biofilme quando comparado com o *Klorkleen Plus (Imporquímica®)*. Tendo em conta o número de infeções nosocomiais no Hospital Pêro da Covilhã em 2023 e os dados relativos à eficácia do Granulado na eliminação do biofilme, justificase a necessidade de criação de um plano de desinfeção periódico dos lavatórios com este desinfetante com o objetivo de contribuir para a redução do número de IACS provocadas por microrganismos multirresistentes, que podem ser transmitidos aos doentes hospitalizados.

Como perspetivas futuras, a utilização da técnica MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*), cuja implementação no laboratório de microbiologia está a ser estudada, pode trazer vários benefícios a este estudo no que diz respeito à análise microbiológica da amostra. Este utiliza como metodologia a espetrometria de massa e compara os resultados obtidos com uma vasta base de dados permitindo uma rápida identificação do microrganismo na amostra. A implementação do MALDI-TOF neste estudo irá poupar tempo e meios na identificação do microrganismo e, além disso, poderá possibilitar uma caracterização total dos microrganismos multirresistentes presentes nos lavatórios. A realização de contagem e comparação das UFC ao longo das semanas, assim como o alargamento das semanas de estudo, são outras abordagens a ser efetuadas como perspetivas futuras com vista a uma melhor análise da eficácia dos desinfetantes. A caracterização total dos microrganismos multirresistentes presentes nos lavatórios e a contagem das UFC ao longo das semanas irá fornecer mais informação acerca do real problema, contribuindo para a prevenção e desenvolvimento de protocolos de desinfeção.

Capítulo 2: Relatório de Estágio

1. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) da Unidade Local de Saúde da Cova da Beira é constituído pelo Laboratório de Patologia Clínica (LPC) do Hospital Pêro da Covilhã e pelo Laboratório do Hospital do Fundão [20]. O serviço tem como principais objetivos a recolha e tratamento das amostras biológicas dos utentes, de modo que possam ser feitas determinações analíticas fiáveis e válidas em tempo útil, de maneira a poder ser estabelecido um diagnóstico clínico para que, posteriormente, caso seja necessário, se possa indicar uma terapia adequada ao diagnóstico do utente [20].

O SPC é constituído por diferentes laboratórios: Autoimunidade, Imunoquímica, Hematologia, Microbiologia, Virologia e Urgência (área hiperligada às outras secções do laboratório). Todos estes setores se encontram em comunicação constante de forma a otimizar o processamento das amostras. Estas amostras podem ser de vários tipos, tais como: sangue, urina, fezes, expectorações, lavados e aspirados, colhidas de acordo com o Manual de Colheitas em contentores específicos e diferentes consoante o tipo de amostra e análise a ser realizada [21]. Estes contentores/tubos de colheita encontram-se identificados através de uma etiqueta de código de barras que possui identificação com o nome do utente, idade, origem, data, sexo, tipo de amostra, número de identificação do doente (N.I.D) e processo. A partir destas etiquetas de códigos de barras é possível a execução direta da análise dos parâmetros solicitados aquando da introdução do contentor/tubo de colheita nos equipamentos automatizados presentes no laboratório [22].

No laboratório do Fundão são realizadas as análises mais urgentes das áreas de Bioquímica e Hematologia, sendo que os restantes pedidos são enviados para o LPC do Hospital Pêro da Covilhã [20].

2. Procedimento Analítico

O procedimento analítico divide-se em 3 fases: fase pré-Analítica, fase analítica e fase pós-analítica.

2.1. Fase Pré-Analítica

Por definição a Fase Pré-Analítica corresponde ao conjunto de atividades realizadas desde que se recebe o pedido de requisição da análise até que se inicia a Fase Analítica [22].

A Fase Pré-Analítica é a fase que requer maior atenção e é aquela que tem maior propício a erros humanos, visto ser a fase que tem maior número de intervenientes, esta fase inicia-se com o pedido dos exames por parte do médico, inclui também a preparação do paciente dependente das análises requisitadas, a colheita da amostra, o transporte e a triagem da mesma (a triagem engloba a receção, confirmação, avaliação, separação e encaminhamento para as devidas secções) [22].

O SPC possui um equipamento automatizado (*Cobas® p612*) para a Fase Pré-Analítica, com o intuito de minimizar os erros humanos associados a esta fase e facilitar o processo de modo a se iniciar a fase analítica o mais rápido possível. Este equipamento, o *Cobas® p612* (Figura 2), identifica as amostras através da leitura do código de barras presente na etiqueta do contentor/tubo e da cor da tampa do mesmo. Este equipamento tem a capacidade de detetar os níveis dos líquidos que os contentores/tubos contêm, verificar as características da amostra (icterícia, lipemia e hemólise), fotografar o tubo e fazer a alíquetagem das amostras que vão para o exterior ou que têm parâmetros a analisar em outros equipamentos automatizados no laboratório, de modo a garantir a rentabilização da amostra. O *Cobas p612* está programado para distribuir as amostras para os diferentes suportes de acordo com os parâmetros a analisar. Depois de todos os parâmetros serem analisados o *Cobas p612* está programado para aquando da leitura do código de barras de um contentor/tubo com todos os parâmetros analisados este é arquivado, sendo-lhe atribuído uma posição num suporte específico para facilitar o rastreamento caso seja necessário repetir a análise de algum parâmetro ou caso seja adicionado algum acrescento. O rastreamento da amostra é garantido pois o equipamento tem um programa associado, o *Infinity*, onde ao se introduzir o número do pedido é possível verificar todo o percurso que o contentor fez até ser arquivado, caso tenha sido arquivado é nos indicado o suporte onde está arquivado e a sua posição. Os arquivos são guardados numa câmara frigorífica durante um período de 4 dias [23].

O *Cobas® p612* apresenta limitações no tamanho dos contentores/tubos que consegue manusear, sendo que os tubos pediátricos e os tubos de urina para análise dos sedimentos têm de ser distribuídos manualmente [23].



Figura 2: Representação do sistema pré-analítico Cobas® p612 utilizado no SPC [23].

2.2. Fase Analítica

Por definição a Fase Analítica consiste na verificação da conformidade da execução dos procedimentos adotados pelo serviço e o Controlo de Qualidade Interno (CQI) [24].

O CQI é efetuado diariamente antes de se processar qualquer amostra e corresponde a todas as medidas destinadas a avaliar as diferentes fases do processo analítico até à obtenção do resultado, utiliza controlos com valores conhecidos para avaliar a exatidão e precisão dos resultados como critério para aceitação ou rejeição. Caso os controlos não satisfaçam os critérios estabelecidos pela casa comercial ou pelo laboratório, procede-se à reavaliação dos reagentes, dos controlos, das condições de execução da técnica e em último caso a uma nova calibração do equipamento [24].

- **Controlo:** Amostra adaptada aos métodos utilizados e destina-se ao cálculo da precisão e exatidão.

- **Calibradores:** Amostra de composição definida qualitativa e quantitativamente em relação aos padrões de referência, esta amostra irá estabelecer uma relação entre os valores medidos e os resultados correspondentes.

A fase analítica começa sempre pela verificação e manutenção dos equipamentos automatizados utilizados no LPC. Após este passo é feita a preparação dos reagentes, a calibração e o controlo dos equipamentos necessários aos procedimentos analíticos a realizar [24]. De salientar que a calibração e os controlos são um passo extremamente importante no que toca ao início da rotina no LPC, pois sem estes não seria possível

calibrar as técnicas e não poderia ser feita a apreciação da precisão e exatidão dos resultados de modo a dar garantia aos parâmetros analisados [24].

Cada controlo tem uma média e um desvio padrão associado, podendo em alguns casos, o mesmo controlo ser usado para controlar mais do que um parâmetro. De modo a analisar os resultados dos controlos são aplicadas as regras de *Westgard* com o intuito de padronizar a interpretação dos resultados, e através dos gráficos de *Westgard* é possível aplicar-se as regras de aceitação, caso os valores dos controlos estejam dentro dos desvios padrões, e de rejeição, caso os valores dos controlos estejam fora dos três desvios padrões. Os resultados dos controlos são enviados automaticamente para o sistema informático do laboratório (*Modulab*) [24].

O Controlo de Qualidade Externo (CQE) corresponde a uma avaliação externa da qualidade dos resultados e é efetuada periodicamente. As amostras para o CQE são recebidas e tratadas como se fosse uma amostra de um utente, porém os resultados obtidos são enviados para as entidades competentes onde é feita uma análise comparativa e estatística entre laboratórios e entre técnicas [24]. Fazem parte destas entidades competentes a Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratórios (SEQC), *United Kingdom National External Quality Assessment* (NEQAS) e Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge (INSA).

Após a calibração dos equipamentos e a análise dos controlos internos, as amostras biológicas dos utentes podem ser então analisadas com a garantia do LPC acerca dos resultados obtidos. Os resultados obtidos são exportados automaticamente para o *Modulab* [24].

2.3. Fase Pós-Analítica

Por definição a Fase Pós-Analítica consiste na validação biopatológica, ou seja, na validação dos resultados das análises efetuadas pelo utente, tendo sempre em conta o seu estado clínico, os tratamentos a que foi alvo ou a que está a ser alvo e os resultados das análises anteriores [25]. Esta validação biopatológica é efetuada pelos Patologistas Clínicos e/ou pelos Técnicos Superiores de Saúde (TSS), sendo que esta fase desempenha um papel importante, pois é a última fase antes da emissão dos resultados para o médico e para o utente, o que faz com que quer os Patologistas Clínicos quer os TSS tenham de ter um bom sentido crítico de forma que a validação biopatológica seja bem efetuada e coerente com o estado atual do utente [25].

3. Laboratório de Imunoquímica

O laboratório de imunoquímica é uma das secções de diagnóstico que constitui o SPC e engloba as áreas da Bioquímica e da Imunologia. Esta secção é responsável pela análise e caracterização dos parâmetros químicos, bioquímicos e imunológicos dos utentes. Nesta secção encontram-se ao dispor dos técnicos uma variedade de equipamentos de análise automatizados, que se distinguem pelo tipo de parâmetros que analisam e pela metodologia usada:

- **Química Analítica:** *Cobas® Serie 8000, Cobas® e 411, Abbott Architect i2000SR e Atellica® NEPH 630 System.*
- **Testes Imunológicos:** *ImmunoCAP™ 250*
- **Eletroforese de Proteínas Séricas:** *Sebia CAPILLARYS 3 OCTA e Sebia HYDRASIS Focusing.*
- **Análise de Urinas** (parâmetros químicos e sedimentos): *Atellica® 1500 Automated Urinalysis System.*

3.1. Cobas® Serie 8000

O equipamento *Cobas® Serie 8000* (Figura 3) é um analisador modular automatizado fabricado pela *Roche Diagnostics*, e o que se encontra presente na secção de Imunoquímica do LPC é constituído por 4 módulos analíticos diferentes: um módulo ISE (Ionograma), um módulo de Química (e502) e dois módulos de Imunologia (e602) [26].

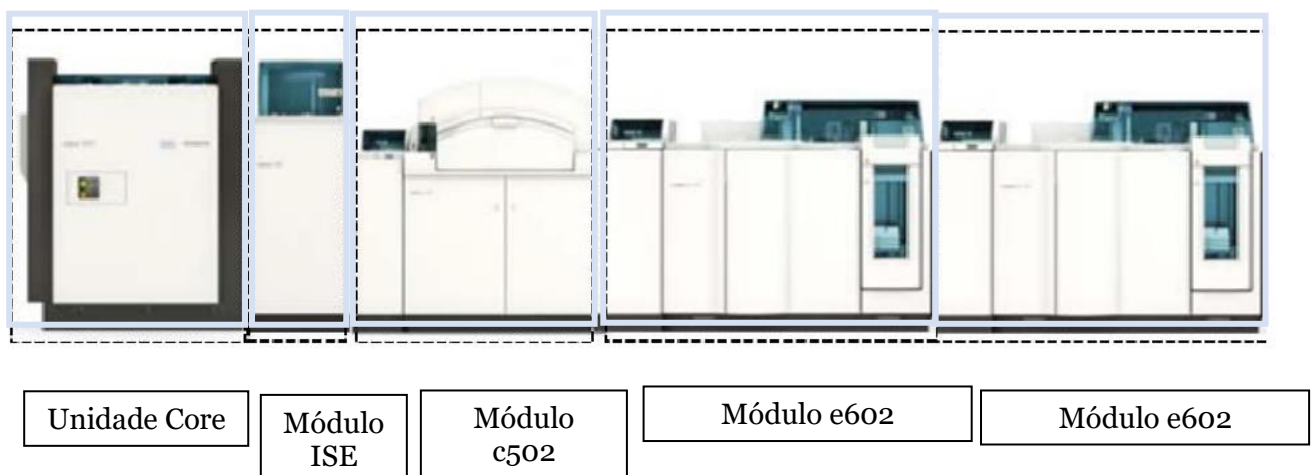


Figura 3: Representação do *Cobas® Serie 8000* existente no SPC [26].

3.1.1. Cobas® Série 8000: Módulo ISE

O módulo ISE (Eléctrodo Seletivo de Iões) é responsável pela medição das concentrações de iões presentes na amostra. Os iões quantificados são o Cloro (Cl^-), o Sódio (Na^+) e o Potássio (K^+) através da técnica de potenciometria indireta.

- A técnica de potenciometria indireta baseia-se na medição do potencial de um eléctrodo indicador em relação a um eléctrodo de referência, este potencial depende da atividade das espécies iónicas que entram nas reacções de oxidação-redução e é expresso através da equação de Nernst. O eléctrodo indicador (ISE) é constituído por uma membrana de vidro permeável aos aniões e catiões a analisar, aquando da sua passagem pela membrana é gerado uma diferença de potencial eléctrico que permite calcular a concentração do respetivo ião [27].

As amostras analisadas por este módulo podem ser soro, urina ou líquido cefalorraquidiano (LCR) [28].

3.1.2. Cobas® Série 8000: Módulo c502

O módulo c502 é o módulo responsável pela análise dos parâmetros químicos e tem a capacidade de efetuar dois tipos de metodologias: Ensaio Fotométrico e Ensaio Imunoturbidimétrico [28].

- O método fotométrico consiste na medição da intensidade da cor gerada através da mistura da amostra com um reagente específico numa cuvete de reacção, quando o feixe de luz alcança o fotómetro após atravessar a cuvete de reacção, este incide sob uma grelha de difração que separa a luz nos diferentes comprimentos de onda que a constituem e reflete-os numa matriz fixa de 12 fotodíodos, cada um destes fotodíodos deteta um comprimento de onda específico, tornando assim possível calcular a concentração de cada analito presente na amostra. A concentração do analito é diretamente proporcional à intensidade da cor gerada, ou seja, quanto mais intensa a cor, maior vai ser a concentração do analito em questão [29].

Através deste método é possível determinar a concentração de: Ácido úrico, Amicacina, α -Amilase, Aspartato Aminotransferase, Alanina Aminotransferase, Bilirrubina Direta, Bilirrubina Total, Cálcio, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Colesterol Total, Creatina Cinase, Creatinina, Ferro, Fosfatase Alcalina, Fósforo, γ -Glutamilttransferase, Magnésio, Proteínas Totais, Triglicéridos e Ureia.

- O método imunoturbidimétrico consiste num imunoensaio onde ocorre uma reação de imunoprecipitação, o que torna este método bastante útil para a medição das concentrações de complexos antigénio-anticorpo e de outras proteínas de grandes dimensões. Nesta técnica o detetor está alinhado diretamente com o feixe de luz incidente e a quantidade de luz detetada diminui à medida que a turbidez do meio aumenta, ou seja, neste método a concentração do analito em causa é diretamente proporcional à turbidez do meio e inversamente proporcional à luz detetada, o que faz com que quanto maior a turbidez, menor é a intensidade de luz detetada, logo maior é a concentração do analito [29].

Através deste método é possível analisar: Alfa-1-Antitripsina, Cadeias leves (Kappa e Lambda), Beta-2-microglobina, C3 e C4, Enzima de Conversão de Angiotensina, Haptoglobina, Imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), Lipoproteína A, Proteína C Reativa, Transferrina e Recetor Solúvel da Transferrina.

As amostras analisadas por este módulo podem ser soro e urina, maioritariamente, mas também podem ser analisados outros líquidos biológicos [27].

3.1.3. Cobas® Série 8000: Módulo e602

O módulo e602 é o módulo responsável pela análise dos parâmetros imunológicos e usa como metodologia a eletroquimioluminescência [30].

- A eletroquimioluminescência consiste num método de quantificação indireto onde intervêm espécies altamente reativas que ao reagirem entre si emitem luz após a aplicação de uma corrente elétrica, para tal são utilizados dois anticorpos monoclonais específicos do antigénio (um anticorpo monoclonal marcado com ruténio e outro marcado com biotina), estes ligam-se ao antigénio presente na amostra e ao reagirem entre si formam um complexo *sandwich* (Técnica *sandwich*). Após a formação destes complexos são adicionadas micropartículas revestidas por estreptavidina à amostra e tendo a estreptavidina grande afinidade para com a biotina faz com que estes complexos se liguem à fase sólida destas micropartículas. A mistura então formada é aspirada para a célula de leitura onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo, é então aplicada uma corrente elétrica ao eletrodo o que provoca a emissão de luz quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. A concentração do analito em causa é diretamente proporcional à luz quantificada, ou seja, quanto mais luz é detetada pelo fotomultiplicador, maior vai ser a concentração do analito [30].

Através deste método é possível analisar: Parâmetros hormonais (Hormona Estimuladora da Tireoide (TSH), Triiodotironina livre (T₃ livre) e Tiroxina livre (T₄ livre)). Marcadores tumorais (Antigénio Específico da Próstata (total e livre), CA 19.9, CA15.3 e Antígeno Carcinoembrionário (CEA)). Marcadores de infecções virais (Anticorpos para o Vírus da Hepatite C (AcHCV), Anticorpos para o HIV (AcHIV), Anticorpos para o Vírus da Hepatite B (AcHBS), Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B (AgHBS), Anticorpos do core do Vírus da Hepatite B (AcHBc), Treponema Pallidum, Rubéola (IgM e IgG), Toxoplasmose (IgM e IgG) e Citomegalovírus (IgM e IgG)). Vitaminas (Vitamina B12 e D), Ferritina, Paratormona (PTH) e Folatos.

As amostras analisadas por este módulo podem ser soro e urina, maioritariamente, mas também podem ser analisados outros líquidos biológicos [27].

3.2. Cobas® e 411

O equipamento *Cobas® e 411* (Figura 4) é um analisador automatizado fabricado pela *Roche Diagnostics* [31]. Este equipamento usa a mesma metodologia, a eletroquimioluminescência, explicada anteriormente (3.1.3), porém uma das diferenças entre estes equipamentos é a capacidade de processar amostras, o módulo e602 tem a capacidade de executar 340 testes/h, enquanto o *Cobas® e 411* executa apenas 80 testes/h. Por esta razão o *Cobas® e 411* é usado como backup em caso do módulo e602 ter uma avaria e é usado para fazer outro tipo de testes com o objetivo de rentabilizar as amostras e aumentar a performance do laboratório [31].

Neste equipamento podemos analisar, para além dos parâmetros analisados no módulo e602, os seguintes parâmetros: Tiroglobulina, Hormona Anti-Mulleriana (AMH), CA 125 e CA 72.4 (marcadores tumorais), Testes de Aidez (AVCMV), Anticorpos contra o antígeno do Vírus da Hepatite B (HBeAc), Antígeno produzido pelo Vírus da Hepatite B (HBeAg), Péptido C e Insulina.

As amostras analisadas por este equipamento podem ser soro ou urina [31].



Figura 4: Representação do Cobas® e 411 existente no SPC [31].

3.3. Abbott Architect i2000SR

O equipamento *Architect i2000SR* (Figura 5) é um analisador de imunoenaios automatizado fabricado pela *Abbott*, e tem como método de quantificação a técnica de quimioluminescência [32].

- A técnica de quimioluminescência corresponde à emissão de luz aquando da passagem de um eletrão de um nível energético superior (estado excitado) para um nível energético inferior. Esta técnica divide-se em quatro passos, no primeiro passo ocorre a combinação e incubação do analito em estudo através do uso de micropartículas revestidas com anticorpos contra o analito em causa. No segundo passo após a incubação é feita uma lavagem com o objetivo de remover todos os compostos que não ficaram ligados às micropartículas, ou seja, vão ser removidos todos os compostos que não são o analito em estudo. No terceiro passo é adicionado um conjugado de anticorpos anti-humanos marcados com acridina (marcador luminescente) que se vai ligar ao analito em estudo e posteriormente no quarto passo são adicionadas à mistura as soluções pré-ativadora (H_2O_2) e ativadora (NaOH) [33].

Após a reação, a quimioluminescência é medida em unidades de luz relativas (ULR), sendo que existe uma relação direta entre a concentração do analito e as ULRs detetadas pelo sistema ótico do equipamento, ou seja, quanto mais luz gerada, maior vai ser a concentração do analito em estudo [33].

Através deste equipamento é possível analisar: Marcadores Cardíacos (Homocisteína, Creatinina Quinase MB, Pró-BNP, entre outros), Hormonas da Fertilidade (Hormona

Luteinizante (LH), Hormona folículo-estimulante (FSH), Prolactina, Progesterona, Estradiol, Testosterona, e SHBG), Hepatites (A e C), Vírus (Epstein-Barr e HLTV tipo I e II), Proteínas Tiroideias (Anti-Tiroglobulina e Anti-Peroxidase Tiroideia) e Cortisol.

As amostras analisadas por este equipamento podem ser soro ou urina [33].



Figura 5: Representação do *Architect i2000SR* existente no SPC da [32].

3.4. ImmunoCAP™ 250

O equipamento *ImmunoCAP™ 250* (Figura 6) é um sistema de análises automatizado fabricado pela *Thermo Fisher*, que possui dois métodos de quantificação com finalidades diferentes. Através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é quantificado a Imunoglobulina E (IgE), esta imunoglobulina é produzida pelo sistema imunológico em resposta à exposição a um determinado alérgeno, que pode ser: pólen de árvores, alimentos, pelo de animais, ervas, entre outros. Através do ensaio imunoenzimático (EIA) é determinada a concentração da calprotectina, esta é libertada durante a ativação e migração dos neutrófilos para as áreas de inflamação, devido à sua capacidade de resistência à degradação no trato gastrointestinal ela pode ser detetada em amostras de fezes, tornando-se um marcador não invasivo permitindo avaliar a inflamação intestinal associada a doenças inflamatórias intestinais [35].

- Método ELISA consiste num imunoensaio sandwich onde ocorrem reações antigénio-anticorpo. Numa primeira fase, o alérgénio em estudo reage com as IgE específicas presentes na amostra, posteriormente, após a lavagem da IgE não específica, são adicionados à amostra anticorpos conjugados com anti-IgE humana, levando à formação de imunocomplexos. Após a incubação com a solução de desenvolvimento,

para-se a reação e mede-se a fluorescência do eluído, quanto maior for a fluorescência, maior é a presença de IgE específica para o alérgeno em estudo na amostra. Estas IgE específicas presentes na amostra devem-se a uma prévia exposição (primeiro contacto) do paciente com o alérgeno. Porém, apesar de apresentar IgE específica para o alérgeno em causa, não significa obrigatoriamente que tenha ocorrido uma reação alérgica imediata, por essa razão, este teste permite perceber a sensibilidade do paciente para com o alérgeno em causa, de modo a identificar uma possível alergia mesmo antes de qualquer tipo de sintomas [35].

- Método EIA consiste num ensaio imunoenzimático onde a fase sólida, neste caso, se encontra revestida com anticorpos monoclonais anti-calprotectina, caso a calprotectina se encontre presente na amostra vai dar-se a ligação à fase sólida, posteriormente, após a lavagem dos compostos não ligados, são adicionados anticorpos anti-calprotectina marcados com uma enzima específica (EliA) que leva à formação de um complexo calprotectina-conjugado. Após a incubação com a solução de desenvolvimento, para-se a reação, e do mesmo modo que no método ELISA, mede-se a fluorescência da mistura da reação, quanto maior for a fluorescência, maior concentração de calprotectina presente na amostra [35].

As amostras analisadas por este equipamento dependem do tipo de estudo que se pretende fazer, para o estudo dos alérgenos usam-se amostras de soro, sendo que para o estudo da calprotectina usa-se amostras de fezes colhidas e preparadas através de um kit de extração apropriado [35].



Figura 6: Representação do *ImmunoCAP™ 250* existente no SPC [34].

3.5. *Atellica*[®] *NEPH 630 System*

O equipamento *Atellica*[®] *NEPH 630* (Figura 7) é um sistema de análises automatizado fabricado pela *Siemens Healthineers* e usa como método de quantificação a imunonefelometria [36].



Figura 7: Representação do *Atellica*[®] *NEPH 630 System* existente no SPC [36].

- A técnica de imunonefelometria baseia-se na reação imunoquímica entre as proteínas presentes na amostra e os anticorpos específicos que levam à formação de imunocomplexos que provocam a turvação do meio. Através desta técnica é possível medir a quantidade de material suspenso no meio por intermédio de um detetor que mede a luz dispersa, este detetor não está colocado na mesma direção do feixe de luz incidente e mede a intensidade da luz dispersa num ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente. A intensidade da luz dispersa apresenta uma relação direta com a quantidade de antigénio presente na amostra, e que por consequência tem uma relação direta com o analito em estudo, logo a concentração do analito é diretamente proporcional à intensidade da luz dispersa, ou seja, quanto mais intensa for a luz dispersa maior vai ser a concentração do analito em estudo [37].

Através deste equipamento é possível analisar: Fator Reumatoide, Beta-2-Microglobulina (β_2M), Cadeias Livres Livres Kappa, Cadeias Livres Livres Lambda, Cistatina C, Apolipoproteína A, Apolipoproteína B e Antiestreptolisina (TASO).

As amostras analisadas por este equipamento podem ser soro, urina e outros líquidos biológicos, mas em maioria são apenas analisadas amostras de soro [37].

3.6. Eletroforese de Proteínas Séricas

A eletroforese de proteínas séricas é uma técnica utilizada com bastante regularidade em laboratórios clínicos, tendo como finalidade a detecção de proteínas séricas patológicas, que são úteis para o diagnóstico de gamopatias monoclonais, patologias renais e hepáticas.

No LPC da ULS Cova da Beira a eletroforese capilar de proteínas séricas é realizada através do equipamento *Sebia CAPILLARYS 3 OCTA*, neste equipamento também é possível realizar uma imunosubtração permitindo dessa forma realizar uma caracterização do componente monoclonal. A mesma caracterização pode ser efetuada por outro equipamento, o *Sebia HYRASIS Focusing*, que faz a caracterização através da imunofixação sérica.

3.6.1. Sebia CAPILLARYS 3 OCTA

O equipamento *CAPILLARYS 3 OCTA* (Figura 8) é um sistema de análises automatizado fabricado pela *Sebia*, que permite realizar a eletroforese capilar de proteínas séricas e imunosubtração [38].

- A eletroforese capilar é uma técnica onde as moléculas com carga elétrica são separadas através da sua mobilidade eletroforética a um nível de pH específico e num tampão alcalino, a separação ocorre de acordo com o pH do eletrólito e do fluxo eletrosmótico, para tal quando a amostra é introduzida na extremidade positiva (ânodo) é-lhe aplicada um potencial elétrico durante alguns segundos, a aplicação deste potencial elétrico irá provocar o movimento dos analitos em direção ao detetor. O resultado da eletroforese capilar de proteínas séricas é o proteinograma ou traçado electroforético (Figura 9) onde é possível observar a separação das proteínas séricas em seis frações/picos: albumina, alfa-globulina (alfa-1 e alfa-2), beta-globulina (beta-1 e beta-2) e gama-globulina [38] [39].

- A imunosubtração sérica é uma técnica onde cinco alíquotas de amostras de soro são pré-incubadas com antissoros humanos (Anti-IgG, Anti-IgA, Anti-IgM, Anti-kappa e Anti-lambda), após agregação é realizada a eletroforese capilar e o proteinograma gerado é comparado com o proteinograma original. A combinação com os antissoros leva ao desaparecimento da imunoglobulina que causa o pico monoclonal suspeito. Caso permaneçam dúvidas acerca do pico monoclonal deve ser efetuada a imunofixação sérica [38] [39].

O diagnóstico é feito de acordo com o tipo de alteração verificada em cada fração/pico, sendo que este tipo de análises deve ser feito apenas em soro, e nunca em plasma de modo a evitar as potenciais interferências das proteínas da coagulação, como o caso do fibrinogénio [38] [39].



Figura 8: Representação do CAPILLARYS 3 OCTA existente no SPC [38].

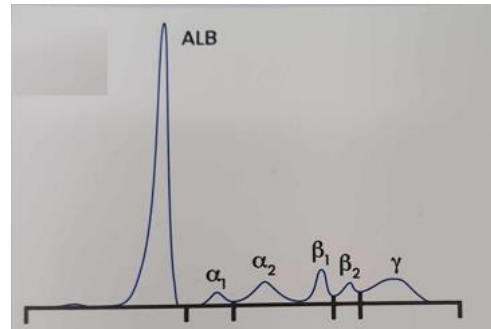


Figura 9: Proteinograma (Albumina, Alfa-globulina (alfa-1 e alfa-2), Beta-globulina (beta-1 e beta-2) e Gama-globulina).

3.6.2. *Sebia HYDRASIS Focusing*

O equipamento *HYDRASIS Focusing* (Figura 10) é um analisador multifuncional para a eletroforese em gel fabricado pela *Sebia*. Este equipamento tem bastante utilidade na ajuda da caracterização das imunoglobulinopatias monoclonais detetadas nos proteinogramas, esta caracterização é feita através de imunofixação [40].

- A Imunofixação Sérica (Figura 11) consiste na separação das proteínas séricas de acordo com a sua carga ao longo de um gel após lhe ser aplicado um potencial elétrico. No segundo passo é aplicado ao gel antissoros, que são constituídos por imunoglobulinas anti-humanas, que se irão ligar às proteínas séricas correspondentes. No último passo o gel é corado com violeta de cristal e é revelado a presença/ausência das proteínas [41].

- A Imunofixação Urinária é bastante semelhante à imunofixação sérica, porém usa-se dois tipos diferentes de géis: Gel de Perfil Urinário e Gel de Bence-Jones. O tipo de gel a usar é tido em conta consoante o valor das proteínas na urina, quando o valor das proteínas na urina é superior a 150 mg/24h usa-se o gel de perfil urinário, caso o valor seja inferior a 150 usa-se o gel de Bence-Jones [41].

A imunofixação do gel de um perfil urinário (Figura 12) é usada quando se pretende caracterizar a proteinúria, sendo possível detetar no gel a proteína de Bence-Jones, proteínas glomerulares e tubulares [41].

Os antissoros usados são específicos contra: proteínas tubulares, proteínas glomerulares, cadeias pesadas G, A e M (antissoro trivalente), cadeias leves Kappa e Lambda e cadeias leves livres Kappa e Lambda [41].

A imunofixação do gel de Bence-Jones (Figura 13) é usada quando se pretende identificar a presença de cadeias leves livres na urina, uma vez que estas só aparecem na urina quando são produzidas em grandes quantidades e o organismo não as consegue metabolizar. As cadeias leves encontram-se ligadas às cadeias pesadas, que juntas formam as imunoglobulinas, estas cadeias leves são produzidas em maior quantidade que as cadeias pesadas pelos plasmócitos, o que resulta num excesso de cadeias leves livres no sangue periférico, quando o metabolismo se encontra bem, estas cadeias leves livres são metabolizadas e eliminadas com normalidade, não levando à acumulação no organismo. Quando a metabolização destas cadeias leves livres se encontra comprometida isso leva à sua acumulação no organismo e por consequência à alteração na produção das imunoglobulinas, o aumento da sua produção está associado a um mau prognóstico e é característico de um mieloma múltiplo [41].

Os antissoros usados são específicos contra: cadeias pesadas G, A e M (antissoro trivalente), cadeias leves Kappa e Lambda e cadeias leves livres Kappa e Lambda [41]. Na imunofixação sérica usa-se amostras de soro, sendo que na imunofixação urinária pode-se usar amostras de urina 24h e também se pode usar amostras de soro [41].



Figura 10: Representação do *HYDRASIS Focusing* existente no SPC [40].



Figura 11: Exemplo de um gel de Imunofixação Sérica.

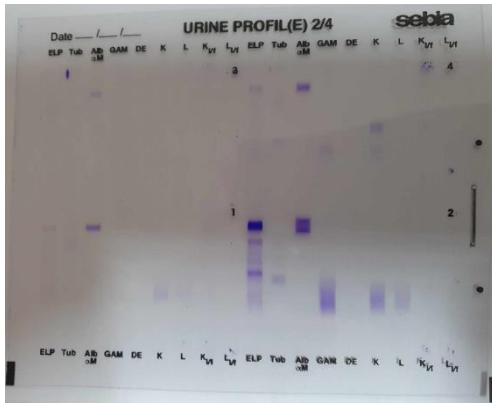


Figura 12: Exemplo de um gel de Perfil Urinário.

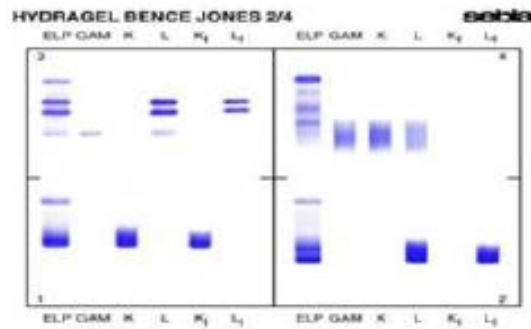


Figura 13: Exemplo de um gel de Bence-Jones.

3.7. *Atellica® 1500 Automated Urinalysis System*

O *Atellica® 1500* (Figura 14) é um equipamento automatizado fabricado pela *Siemens Healthineers* que permite analisar a tira e os sedimentos urinários. Para tal este equipamento é constituído por dois módulos: módulo CLINITEK Novus responsável pela análise da tira urinária e o módulo *Atellica UAS 800* que é responsável pela análise dos sedimentos urinários [42].

- O módulo CLINITEK Novus realiza uma análise semi-quantitativa através da leitura de tiras de urina. Este módulo possui uma câmara digital que captura todo o espectro de cores RGB para calcular a cor de cada parâmetro da tira, sendo assim possível analisar os parâmetros de glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, pH, hemoglobina, corpos cetónicos, nitritos e leucócitos [42].

- O módulo *Atellica UAS* realiza a análise do sedimento urinário com o objetivo de determinar quantitativamente parâmetros como os leucócitos, macrófagos e células epiteliais. Esta análise é feita através de fotos retiradas pelo equipamento que podem ser visualizadas no sistema informático acoplado ao equipamento [42].

Para exceções, como é o caso de amostras de urina com volume insuficiente, o LPC possui kits de tiras e microscópios onde é possível se fazer a análises dos parâmetros.



Figura 14: Representação do *Atellica® 1500 Automated Urinalysis System* existente no SPC [42].

3.8. Testes Rápidos

Os testes rápidos realizados no laboratório de Imunoquímica têm como objetivo a obtenção de resultados num curto período de tempo, de modo a fornecer informações rápidas sobre a presença ou ausência de determinadas condições. Os testes rápidos realizados no laboratório de Imunoquímica são para a pesquisa de drogas de abuso (Anfetaminas, Benzodiazepinas, Cannabis, Cocaína e Morfina) e teste de gravidez [43].

Estes testes são frequentemente usados em situações em que a obtenção de resultados rápidos é crucial para o tratamento imediato do paciente, como por exemplo a administração de um certo tipo de medicamento, no entanto, é importante notar que, embora os testes rápidos ofereçam conveniência e agilidade, alguns podem ter sensibilidade e especificidade variáveis em comparação com métodos laboratoriais mais demorados e complexos. Portanto, a escolha do teste dependerá da situação clínica específica [43].

As amostras usadas são amostras de urina [43].

3.8.1. Drogas de Abuso

Os testes rápidos para a pesquisa de drogas de abuso (Anfetaminas, Benzodiazepinas, Cannabis, Cocaína e Morfina) têm por base a imunocromatografia que envolve a interação entre anticorpos específicos e antígenos. No caso de existirem drogas de abuso na urina irá ocorrer a saturação dos locais de ligação ao anticorpo específico e verifica-se o aparecimento de uma linha vermelha na região da linha de teste, para além de se verificar uma linha vermelha na região do controlo, o que indica que o teste decorreu com normalidade, nesta situação temos um teste positivo para a droga de abuso em causa. Caso não haja drogas de abuso na urina, não irá ocorrer a saturação dos locais de ligação, o que leva ao não aparecimento de uma linha vermelha na região da linha de teste, neste caso temos apenas o aparecimento de uma linha vermelha na

região de controlo, nesta situação temos um teste negativo para a droga de abuso em causa [43].

Em casos onde não aparece a linha de controlo, significa que o teste foi mal executado, e portanto nenhuma conclusão se pode tirar [43].

3.8.2. Teste de Gravidez

Os testes rápidos para a gravidez têm por base o imunoensaio *Sandwich*, que se baseia na ligação da gonadotrofina coriónica humana (hCG) presente na amostra e o anticorpo existente no teste (anti-hCG), caso se verifique a presença de hCG na amostra, esta liga-se ao anticorpo formando um complexo, com a formação do complexo verifica-se o aparecimento de uma linha colorida na região da linha de teste. Caso não haja hCG na amostra o complexo não se forma, portanto não há o aparecimento de uma linha colorida na região da linha de teste [43].

Da mesma forma que os testes rápidos para pesquisa de drogas de abuso, os kits dos testes de gravidez também têm uma linha de controlo que ajuda a perceber se o teste foi bem realizado. Testes onde não se verifica o aparecimento da linha colorida na região do controlo não se deve ter em conta os resultados [43].

4. Laboratório de Microbiologia

O laboratório de microbiologia é uma das secções de diagnóstico que constitui o SPC da ULS Cova da Beira desempenhando um papel fundamental e imprescindível na prevenção, diagnóstico e tratamento de infeções, contribuindo dessa forma para a melhoria da segurança e bem-estar dos utentes.

O laboratório de microbiologia é um elemento essencial na vigilância das epidemiologias hospitalares, encontrando-se muitas vezes ligado a procedimentos de rastreio que visam a melhoria da segurança hospitalar, não só para os utentes, mas também para todos os trabalhadores da ULS Cova da Beira.

Neste laboratório realizam-se diversos tipos de análises, entre elas: análises bacteriológicas, micobacteriológicas, micológicas e parasitológicas.

O processamento de uma amostra biológica é uma das etapas mais importantes para a obtenção de resultados confiáveis e precisos, sendo que é preciso garantir que esta não é contaminada durante o seu processamento, para tal deve-se sempre processar a amostra em condições estéreis (trabalhar à chama (bico de bunsen) ou trabalhar na câmara de fluxo laminar), deve-se fazer a inoculação para os meios de cultura adequados, os meios de cultura devem ser incubados às temperaturas devidas e os tempos de incubação devem ser respeitados.

As amostras são semeadas, após 24 horas de incubação todas as placas são observadas representa outro passo bastante importante, pois aqui podemos ver se todo o processamento da amostra desde que chegou ao laboratório foi bem efetuado e se a identificação do patógeno vai de encontro à morfologia das colónias que cresceram nos respetivos meios. Após a visualização da bancada os patologistas clínicos validam os resultados e passam a informação ao médico acerca das resistências aos antibióticos que aquele microrganismo pode ou não ter, com esta informação o médico consegue adequar a terapêutica por forma a que o utente seja tratado com o máximo de rigor, sem que a sua saúde e bem-estar sejam postos em causa.

4.1. Meios de Cultura

Os meios de cultura promovem as condições necessárias para o crescimento microbiano, estes podem ser diferenciados em três categorias consoante as diferentes exigências metabólicas [44,45]:

- **Não Seletivo:** Meio que favorece o crescimento da maior parte dos microrganismos que não tenham nenhuma exigência específica para o seu crescimento [44,45].
- **Seletivo:** Meio que favorece o crescimento de alguns tipos de microrganismos específicos através da inibição do crescimento dos restantes [44,45].
- **Diferenciais:** Este tipo de meio permite ser feita uma pré-identificação através das características exibidas pelas colónias após crescimento e incubação nas condições adequadas [44,45].

Os meios de cultura podem ainda ser separados em meios sólidos e líquidos dependendo da sua consistência física. Os meios sólidos são usados para o isolamento e

crescimento de microrganismos em colônias, enquanto, os meios líquidos são usados para enriquecer a cultura microbiana presente na amostra, por exemplo em líquidos biológicos, levando a um crescimento exponencial dos microrganismos provocando a turvação do meio [44,45].

4.1.1. Meios Líquidos

Os meios de cultura líquidos utilizados no laboratório de microbiologia da ULS Cova da Beira encontram-se dispostos na seguinte tabela:


Tabela 11: Meios líquidos utilizados no laboratório de microbiologia.

Meio	Características	Incubação
Caldo de Carne [96]	Meio não seletivo que favorece o crescimento da maior parte dos microrganismos anaeróbios. É usado como meio enriquecedor em culturas onde possam estar presentes um número reduzido de uma população microbiana.	Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO ₂ durante um período de 7 dias.
Todd-Hewitt [97]	Meio seletivo que favorece o crescimento de bactérias Gram Positivas, principalmente de <i>Streptococcus β-hemolíticos</i> , o crescimento é controlado através do uso de antibióticos que inibem o crescimento das bactérias Gram Negativas.	Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO ₂ durante 24h.
Tetrationato [98]	Meio seletivo que favorece o crescimento de <i>Salmonella spp.</i> , o crescimento seletivo é controlado com recurso a componentes que inibem o crescimento de bactérias Gram Positivas e de muitas Gram Negativas. Após a cultura microbiana ser enriquecida com este meio deve ser efetuada a passagem para um meio sólido.	Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO ₂ durante 6h.
Lownstein-Jensen [99]	Meio seletivo semi-sólido que favorece o crescimento e isolamento de micobactérias, possui na sua composição verde malaquita que inibe o crescimento de bactérias Gram Positivas.	Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO ₂ durante um período de 45 dias.

4.1.2. Meios Sólidos

Os meios de cultura sólidos utilizados no laboratório de microbiologia da ULS Cova da Beira encontram-se dispostos na seguinte tabela [100]:

Tabela 12: Meios sólidos utilizados no laboratório de microbiologia.

Meio	Características	Incubação
Gelose Sangue		
	Meio diferencial e não seletivo que favorece o crescimento e isolamento de bactérias fastidiosas e não fastidiosas, permite a deteção de hemólise (alfa e beta) devido à presença de sangue de carneiro desfibrinado na sua composição.	Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO ₂ durante 24-48h.

Gelose Chocolate + PolyVitex (PVX)	<p>Meio diferencial e não seletivo que favorece o crescimento e isolamento de bactérias fastidiosas pertencentes ao gênero <i>Neisseria spp.</i>, <i>Haemophilus spp.</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>. Este meio destina-se principalmente ao crescimento de estirpes mais exigentes.</p>	<p>Estufa 35°C ± 2°C em atmosfera CO₂ durante 24-48h.</p>
Gelose Müller-Hinton	<p>Meio não seletivo usado na realização dos TSA com discos ou a tiras ETEST®. A sua composição favorece o crescimento de bactérias não fastidiosas.</p>	<p>Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24-48h.</p>
Gelose CNA	<p>Meio seletivo que favorece o crescimento e isolamento de bactérias Gram Positivas fastidiosas, as bactérias Gram Negativas são inibidas de crescer devido à presença de ácido nalidixico e colimicina na sua composição. Também é possível detetar a hemólise devido à presença de sangue de carneiro na composição da gelose.</p>	<p>Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24-48h.</p>
Gelose MacConkey	<p>Meio diferencial e seletivo que favorece o crescimento e isolamento de bactérias Gram Negativas, o crescimento das bactérias Gram Positivas é inibido devido a presença de sais biliares na composição da gelose, para além dos sais biliares este meio também contém na sua composição cristal violeta que permite distinguir as colónias fermentadoras de lactose (colónias rosa/vermelhas) das colónias não fermentadoras de lactose (cor bege ou incolor)</p>	<p>Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24h.</p>
Gelose Chocolate Haemophilus (HAE)	<p>Meio seletivo que favorece o crescimento e isolamento de bactérias fastidiosas, sendo um meio seletivo para <i>Haemophilus spp.</i> a partir de amostras polimicrobianas, a seletividade é garantida através da presença de agentes antimicrobianos e antifúngicos na sua composição.</p>	<p>Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24h.</p>
Gelose Chocolate PolyVitex VCAT3	<p>Meio seletivo que favorece o crescimento e isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> a partir de amostras polimicrobianas, a seletividade é garantida pela combinação de agentes microbianos e antifúngicos (VCAT = vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim). Este tipo de meio também é usado no estudo de exsudados vaginais.</p>	<p>Estufa 35°C ± 2°C em atmosfera CO₂ durante 24h.</p>

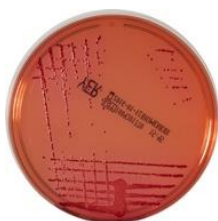
Gelose SS



Meio diferencial e seletivo que favorece o crescimento e isolamento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* As colônias fermentadoras de lactose apresentam uma cor rosa, as não fermentadoras apresentam-se incolor. As colônias que reduzem o tiosulfato levam à produção de H₂S (as colônias contêm um ponto negro no centro). As colônias de *Salmonella spp.* são incolores/amarelo-pálido e podem conter ou não um centro negro, as colônias de *Shigella spp.* são incolores/rosa-pálido sem a presença do centro negro. O crescimento de bactérias Gram Positivas é inibido pela presença de sais biliares na composição da gelose.

Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24-48h.

Gelose Yersinia



Meio diferencial e seletivo que favorece o crescimento e isolamento de *Yersinia spp.*, esta seletividade é garantida pela presença de cefsulodina, irgason e novobiocina na composição da gelose. O manitol e o vermelho neutro presentes permitem a diferenciação das colônias de Yersinia spp. (colônias rosa-escuro a vermelho).

Estufa 30°C ± 2°C durante 24-48h.

Gelose Campyloset



Meio seletivo que favorece o crescimento e isolamento de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. A seletividade é garantida pela presença de agentes antibióticos e antifúngicos presentes na composição da gelose, estes inibem a maioria dos contaminantes. As colônias da *Campylobacter spp.* apresentam-se como pequenas e aczentadas, e por vezes estendem-se ao longo das estrias de inoculação.

Estufa 40°C ± 2°C em atmosfera de microaerofilia durante 48h.

Gelose Candida



Meio diferencial e seletivo que favorece o crescimento e isolamento de leveduras e permite a identificação direta de *Candida albicans*, esta identificação direta é feita pela coloração azul das colônias, devido à hidrólise de um substrato cromogéneo de hexosaminidase.

Estufa 30°C ± 2°C durante 24-48h.

Gelose Sabouraud



Meio seletivo que favorece o crescimento e isolamento de leveduras e fungos a partir de amostras polimicrobianas. A presença de gentamicina leva à inibição de bactérias Gram Positivas e Negativas, o pH deste meio é ácido, o que favorece o crescimento fúngico.

Estufa 30°C ± 2°C durante 24-48h.

Gelose Manitol Salgado (MSA)



Meio diferencial e seletivo que favorece o crescimento e isolamento de *Staphylococcus spp.*, e é bastante útil na orientação da identificação de *Staphylococcus aureus*, pois estes fermentam o manitol presente na composição do meio, levando à alteração da cor do meio e à produção de colônias amarelas.

Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24h.

Gelose Granada



Meio diferencial e seletivo que favorece o crescimento e isolamento de *Streptococcus β-hemolíticos*, mais propriamente de *Streptococcus agalactiae*. Após a incubação as colônias de *S. agalactiae* apresentam cor laranja, enquanto as restantes espécies de *Streptococcus β-hemolíticos* apresentam cor branca ou incolor. Este meio é bastante útil no rastreio de grávidas.

Estufa 35°C ± 2°C em atmosfera de anaerobiose restrita durante 24h.

Gelose MHE + 5% sangue de carneiro



Meio seletivo usado na realização dos TSA com discos ou a tiras ETEST® em estirpes que necessitam de sangue para o seu crescimento.

Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24h.

Gelose MRSA



Meio diferencial e seletivo que favorece o crescimento e isolamento de *S. aureus resistente à meticilina* (MRSA), as colônias de MRSA apresentam-se com uma coloração verde devido à produção de alfa-glucosidase, por parte deste microrganismo, na presença de cefoxitina.

Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24h.

Gelose SMAC CT (MacConkey com Sorbitol)



Meio seletivo que favorece o crescimento e isolamento de *Escherichia coli O157:H7*, esta seletividade é visualizada através da coloração das colônias, as colônias de *E. coli O157:H7* apresentam-se com cor incolor e com um centro castanho, enquanto as outras estirpes de *E. coli* fermentam o sorbitol e dão origem a colônias rosa/vermelhas. O crescimento de bactérias Gram Positivas e de Enterobactérias é assegurada pela presença de cefixina, sais biliares, cristal violeta e telurito.

Estufa 35°C ± 2°C + 5% CO₂ durante 24h.

4.2. Tipos de Inoculação

O processo de inoculação corresponde à transferência da amostra para um meio de cultura, que pode ser sólido ou líquido [45].

No laboratório de microbiologia do SPC da ULS Cova de Beira são efetuados quatro tipos de inoculação, consoante a amostra recebida e o procedimento utilizado, as inoculações realizadas são: Inoculação em placa de Petri, em caldo de cultura, por esfregaço e ágar inclinado.

4.2.1. Inoculação em placa de Petri

Para este método de inoculação, de modo a efetuar uma boa sementeira, os meios sólidos são não desidratados, mas cuja superfície se encontra seca e sem gotículas de condensação na tampa, caso isso se verifique o meio sólido não deve ser usado. A sementeira é efetuada com recurso a uma ansa calibrada para levar sempre a mesma quantidade de amostra e pode ser efetuada de maneiras diferentes:

- **Esgotamento do produto (Sementeira por Quadrantes):** Técnica quantitativa, onde no final se obtêm colónias isoladas, e é realizada colocando uma pequena porção do produto com uma ansa calibrada no 1º quadrante e depois são efetuadas estrias, como podemos ver na Figura 15B [45].

- **Estria simples:** Técnica semi-quantitativa, onde o objetivo passa pela avaliação de certas propriedades metabólicas (como a produção de certo tipo de enzimas e pigmentação), esta técnica é usada aquando do exame cultural de urinas e de lavados bronco-alveolares. Com recurso a uma ansa calibrada é feita uma linha reta na placa seguida de uma estria em zig-zag em toda a extensão da placa como podemos ver na Figura 15A [45].

- **Inundação:** É usado uma pipeta calibrada para colocar uma pequena gota do produto e depois este é espalhado com recurso a movimentos ovais [45].

- **Técnica de Maki:** Esta técnica é usada na sementeira de cateteres, onde este é colocado diretamente no meio sólido e posteriormente é rolado ao longo de toda a extensão da placa [44,45].

- **Sementeira em rede:** São transferidos 100 µL da cultura para o meio sólido e o espalhamento é feito em forma de rede em toda a extensão da placa, como podemos ver

na Figura 16. Este tipo de sementeiras é muito utilizado aquando da realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana manuais [45].

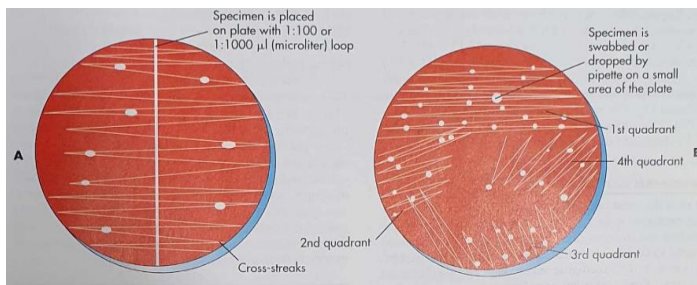


Figura 15: (A) - Representação da inoculação por estria simples. (B) - Representação da inoculação por esgotamento do produto [45].

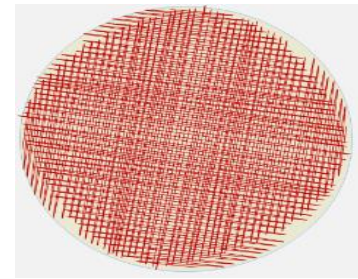


Figura 16: Representação de inoculação por sementeira em rede [45].

4.2.2. Inoculação em caldo de cultura

Este método de inoculação envolve a adição da amostra diretamente no meio líquido e tem como o objetivo a produção de biomassa microbiana em grande escala para posterior inoculação em meios sólidos [44,45].

4.2.3. Inoculação por esfregaço

Este tipo de inoculação é usado para permitir a observação microscópica dos microrganismos e consiste no espalhamento da amostra numa lâmina de vidro. O espalhamento pode ser efetuado com recurso a uma ansa, zaragatoa, ou por esmagamento do produto (como é o caso das expetorações), após o produto ser espalhado a lâmina é fixada à chama e, posteriormente, são efetuadas as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen consoante o pedido [44,45].

4.2.4. Inoculação em ágar inclinado

Para este tipo de inoculação o laboratório de microbiologia utiliza o meio de *Lownstein-Jensen*, meio semi-sólido, e a inoculação pode ser feita com recurso a uma ansa e é efetuada uma estria ao longo do meio inclinado, ou então a amostra pode ser colocada com recurso a uma micropipeta, deixando depois o meio incubar numa posição inclinada, de modo que a amostra líquida cubra todo o meio [44,45].

4.3. Produtos Biológicos

4.3.1. Urina

A urina é o produto biológico mais frequente no laboratório de microbiologia, sendo a colheita e transporte até ao laboratório efetuada através de um contentor específico e esterilizado [21].

As infeções associadas ao trato urinário (ITU) são o tipo de infeções mais comuns no ser humano, e que geralmente são causadas por bactérias da flora saprófita intestinal, que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. Entre os agentes etiológicos mais frequentes de ITU temos as Enterobactereáceas com grande destaque para a *Escherichia Coli*. No caso de doentes internados e com complicações que levam à necessidade de algaliação o espetro etiológico alarga-se a outro tipo de microrganismos tais como: *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativos*, *Enterococcus spp.* e Fungos [44].

A urina apresenta-se como um líquido biológico estéril, porém aquando da sua passagem através da uretra durante a micção, esta arrasta os microrganismos que a colonizam, podendo induzir em erros a interpretação da urocultura, deste modo quando é solicitada a colheita de urina a zona dos genitais deve ser limpa com água e sabão/soro, e para além da limpeza deve ser descartado o primeiro jato de modo a não haver contaminações por microrganismos presentes na uretra [21,44].

A urina pode então ser colhida por micção “jato médio”, por punção de cateter urinário ou por punção supra-púbica [21,44].

Após a colheita, a urina deve ser enviada para o laboratório o mais rápido possível e deve ser processada até uma hora após a colheita. No caso de não ser possível a urina deve ser refrigerada a 4°C e pode então ser processada até às 24h após a colheita, após as 24h caso seja necessário repetir algum teste o laboratório sugere sempre uma nova colheita [21,44].

No laboratório de microbiologia do SPC da ULS Cova da Beira o processamento da urina envolve:

Urocultura: Corresponde ao processo de semear a urina nos meios de cultura sólidos Gelose de Sangue e Gelose MacConkey através de uma ansa calibrada de 1 µL e a

sementeira é efetuada usando o método semi-quantitativo. Nos casos onde há a suspeita de candidíase, também é feita a sementeira em Gelose Candida, que corresponde a um meio sólido cromogéneo onde é possível verificar, caso seja o caso, o crescimento de microrganismos do tipo *Candida spp.*, a sementeira também é efetuada segundo o método semi-quantitativo. Podemos falar em bacteriúria na presença de pelo menos 100000 UFC/mL. Nos casos onde se verifique o crescimento polimicrobiano (mais do que 2 tipos diferentes de colónias) o laboratório sugere uma nova colheita, pois alguma coisa durante a colheita ou transporte correu mal [46].

Exame Citológico: Após a realização da urocultura é feita uma alíquota que é colocada no equipamento Atellica® 1500 Automated Urinalysis System de modo a poder ser efetuado a análise da tira e dos sedimentos urinários [46].

Pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistens (B.A.A.R): Para os casos onde é pedido uma pesquisa de B.A.A.R é feita uma alíquota de urina que é centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm, de seguida é feito um esfregaço através da técnica de citospin, o esfregaço é fixado à chama e efetuada a coloração de Ziehl-Neelsen. Através desta coloração podemos analisar a presença de bacilos álcool ácido resistentes na urina tais como: *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* [46].

Teste rápido para a deteção de antigénios urinários (pesquisa de infeção por *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*): Para este teste utiliza-se um kit específico *CerTest S. pneumoniae+Legionella one step combo*, que corresponde a um teste imunocromatográfico onde nas linhas de teste se encontram anticorpos monoclonais anti-*S.pneumoniae* e anti-*L.pneumophila*, caso se encontrem presentes na urina antigénios específicos para estes microrganismos, estes vão se ligar aos anticorpos monoclonais presentes nas linhas de teste e a linha apresenta-se de cor vermelha. De salientar que este teste não deve ser usado como método de pesquisa de *S.pneumoniae* nem de *L.pneumophila*, uma vez que a presença destes antigénios na urina não nos indica se a infeção é atual, pois estes antigénios mantêm-se presentes na urina durante algum tempo, podendo ser o resultado de uma infeção prévia [47].

4.3.2. Fezes

As fezes são usadas para detetar infeções associadas ao aparelho gastrointestinal, estas infeções têm uma alta incidência na população em geral, afetando maioritariamente as crianças e os idosos [44].

Nas fezes podem ser efetuados os seguintes testes: coprocultura, testes parasitológicos, testes para a pesquisa de vírus, testes para pesquisa bacteriana e pesquisa do sangue oculto. De salientar que no laboratório o processo de coprocultura é descartado para fezes não diarreicas e em situações onde o doente já se encontra internado há mais de 3 dias [48].

Coprocultura: Corresponde ao processo de semear as fezes nos meios sólidos: Gelose MacConkey, Gelose SS, Gelose *Yersinia*, Gelose *Campylosel* e no meio líquido Tetracionato com lugol (sendo depois passado para Gelose SS). A sementeira é efetuada por quadrantes com esgotamento do produto ao longo dos quadrantes. Nas situações de fezes diarreicas de crianças com idade menor ou igual a 5 anos também é efetuada a sementeira em meio Gelose SMAC, que é utilizado com o intuito de detetar a *Escherichia coli* com o serotipo O157:H7 [48].

Testes Parasitológicos:

- **StorAX SAF®** → Utiliza-se um kit específico onde o objetivo desse kit é concentrar a amostra para posteriormente ser feita uma análise microscópica. Nessa análise podem-se observar parasitas presentes na amostra tais como: Protozoários, ovos de helmitas, cistos, oocistos e larvas [51].
- **Rapid-VIDITEST Crypto-Giardia®** → Consiste num teste rápido imunocromatográfico para a pesquisa qualitativa de *Cryptosporidium* e *Giardia*. O kit contém anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*, e caso se encontrem presentes na amostra antigénios específicos destes microrganismos estes vão reagir com os anticorpos monoclonais presentes na fita de teste, originando o aparecimento de uma linha vermelha na zona de teste [50].

Pesquisa de Vírus:

- **CerTest Rotavírus e Adenovírus** → Consiste num teste rápido imunocromatográfico para a pesquisa qualitativa de Rotavírus e Adenovírus, estes são a principal causa de gastroenterites nos bebés e crianças. O kit contém anticorpos monoclonais anti-Rotavírus e anti-Adenovirus, e caso se encontrem presentes na amostra antigénios específicos para estes vírus estes reagem com os anticorpos monoclonais presentes na fita de teste, originando o aparecimento de uma linha vermelha na zona de teste [52]. Por norma caso a pesquisa destes vírus seja negativa faz-se sempre a pesquisa do Norovírus.

- **RIDA®QUICK Norovírus** → Consiste num teste rápido imunocromatográfico para a pesquisa qualitativa de Norovírus, este tipo de vírus são vírus de RNA que provocam gastroenterites e estão fortemente associados a lares e hospitais. O kit contém anticorpos monoclonais anti-Norovírus, e caso se encontrem presentes na amostra antígenos específicos para este vírus estes reagem com os anticorpos monoclonais presentes na fita de teste, originando o aparecimento de uma linha vermelha na zona de teste confirmando assim a presença do Norovírus [53]. Caso ambos os testes de pesquisa de Rotavírus + Adenovírus sejam negativos e caso o teste de pesquisa do Norovírus também seja negativo recomenda-se fazer coprocultura das fezes, caso estas sejam diarreicas, de modo a tentar encontrar o microrganismo que está a provocar a diarreia [48].

Pesquisa Bacteriana:

- **CerTest BIOTEC Clostridium difficile GDH + Toxin A + Toxin B** → Consiste num teste rápido imunocromatográfico para a pesquisa qualitativa de *Clostridium difficile*, Glutamato Desidrogenase (GDH), Toxina A e Toxina B. o *C.difficile* é a causa mais comum de diarreias em ambientes hospitalares e lares nos países desenvolvidos tendo uma elevada taxa de mortalidade em todo o mundo. Este microrganismo desenvolve-se preferencialmente após o uso de antibióticos que matam a flora concorrente, tendo sido essa flora concorrente eliminada o *C.difficile* consegue-se desenvolver e libertar dois tipos de toxinas (Toxina A e Toxina B) que são responsáveis pelas manifestações clínicas que variam desde diarreia aquosa, colite pseudomembranosa e morte. O GDH é uma enzima produzida em largas quantidades pelo *C.difficile* pelo que se torna um importante marcador para a deteção deste microrganismo. O kit contém anticorpos monoclonais anti-GDH, anti-Toxina A e anti-Toxina B. Caso o *C.difficile* se encontre presente na amostra iremos ter o aparecimento de uma linha vermelha na zona do GDH, sendo que o aparecimento de uma linha vermelha na zona da Toxina A e da Toxina B vai depender se o *C.difficile*, naquele caso em específico, está a produzir as toxinas ou não, de qualquer forma caso o resultado do GDH seja positivo o médico deve ser contactado de modo a que o doente possa ser monitorizado e avaliada a produção ou não produção das toxinas ao longo do tempo [54].
- **Pylori-Strip Coris BioConcept** → Consiste num teste rápido imunocromatográfico para a pesquisa qualitativa de *Helicobacter pylori*, esta bactéria é a principal causadora de gastrites crónicas e úlceras no estômago. O

kit contém anticorpos monoclonais anti-*H.pylori*, e caso se encontrem presentes na amostra antigénios específicos para esta bactéria estes reagem com os anticorpos monoclonais presentes na fita de teste, originando o aparecimento de uma linha vermelha na zona de teste [52].

Pesquisa de sangue oculto:

- O cancro colorretal é um dos tipos de cancro mais diagnosticado e é uma das principais causas de morte associadas ao cancro. O teste de pesquisa de sangue oculto tem como objetivo detetar a presença de hemoglobina humana nas amostras de fezes com vista a detetar cancro colorretal em fase precoce. Este teste baseia-se num imunoensaio cromatográfico onde o kit contém na fita de teste anticorpos anti-hemoglobina, sendo que caso se encontre presente nas fezes hemoglobina, esta vai se ligar aos anticorpos presentes na fita de teste e vai levar ao aparecimento de uma linha vermelha na zona de teste [49].

4.3.3. Aparelho Respiratório

As infeções relacionadas com o aparelho respiratório podem ser divididas em infeções do trato respiratório superior e infeções do trato respiratório inferior, estas são uma das principais causas de morte em todo mundo afetando maioritariamente a população mais idosa [44].

O laboratório segue o critério de Murray e Washington aquando do exame microscópico após coloração de Gram, onde apenas devem ser processadas as amostras com menos de 25 células epiteliais por campo. Caso não cumpra estes critérios a amostra não é semeada, sendo rejeitada e pedida nova colheita [44].

No laboratório são processadas: expetorações, secreções brônquicas, aspirados brônquicos e lavados bronco-alveolares (LBA).

4.3.3.1. Expetorações e Secreções Brônquicas

O primeiro passo efetuado no laboratório, independentemente do tipo de amostra respiratória, é a realização de dois esfregaços pela técnica de esmagamento para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen, com o objetivo de avaliar o número de células epiteliais e polimorfonucleares presentes na amostra e pesquisar a presença de B.A.A.R [56].

Caso a amostra de expetoração/secreção brônquica se encontre dentro dos critérios de Murray e Washington o exame cultural passa pela realização de uma sementeira por quadrantes nos meios Gelose de Sangue, Gelose Chocolate *Haemophylus* e Gelose MacConkey. É necessário ter em atenção se amostra é de um doente que se encontra internado na UCI, sendo que nesses casos a sementeira é feita em mais dois meios sólidos, sendo eles Gelose Candida e Gelose Sabouraud de modo a avaliar a possível presença de fungos e leveduras [56].

Caso seja pedida a pesquisa de B.A.A.R é necessário separar uma pequena porção da amostra para um frasco apropriado para a análise das microbactérias na secção das micobactérias [56].

4.3.3.2. Aspirado Brônquico e Lavado Bronco-Alveolar (LBA)

Estas amostras são colhidas por broncoscopia, que consiste num procedimento médico onde o broncoscópio é inserido através da boca ou nariz do paciente até às vias respiratórias inferiores. Da 1º amostra deve ser retirada uma alíquota para cultura de B.A.A.R, da 2º amostra é feito exame cultural e microscópico e da 3º amostra é feita citometria de fluxo. Caso chegue ao laboratório apenas uma amostra deve-se fazer todos os testes a partir dessa amostra [55].

No que toca ao exame cultural do LBA, este deve ser previamente agitado no vortex durante 30 a 60 segundos, após o vortex a sementeira é feita com uma ansa calibrada de 10 µL nos meios sólidos Gelose Chocolate PVX, Gelose de Sangue e Gelose MacConkey. Para o exame microscópico a amostra, após ter sido realizada a sementeira, deve ser centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm e devem ser feitas duas lâminas por citospin para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen [55].

O procedimento dos aspirados brônquicos é o mesmo que para as secreções e expetorações, a única diferença é que antes de se processar a amostra deve ser feita uma concentração da amostra por centrifugação durante 10 minutos a 2000 rpm [55].

4.3.4. Hemoculturas

Uma grande maioria das doenças infecciosas podem provocar bacteriemia (presença de bactérias no sangue). O sangue é um produto biológico estéril, pelo que o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infeção [44].

Uma hemocultura corresponde a uma colheita de sangue efetuada por punção venosa de qualquer das veias periféricas, sendo que aquando da colheita o local deve ser desinfetado com uma solução antisséptica de modo circular e do interior para a periferia, da mesma forma que a garrafa de hemocultura (Figura 17) onde o sangue vai ser colocado também deve ser desinfetada. O volume de sangue a ser colhido é um ponto crítico, uma vez que a concentração dos microrganismos na maioria das bacteremias é baixa, principalmente se o doente já se encontra sob terapêutica antibiótica, tendo isto de ser retirada, nos adultos, entre 10 a 30 mL de sangue por punção, e no caso das crianças, deve ser retirado entre 1 a 5 mL [44,58].

No total são colhidas quatro garrafas de hemocultura por paciente, duas por cada braço, uma aerobiose e outra de anaerobiose. Após a chegada ao laboratório estas são incubadas no aparelho *BACT/ALERT*® 3D (BioMérieux) (Figura 18) cuja função é de identificar a presença/ausência de microrganismos nas hemoculturas através da alteração de cor no fundo das garrafas, ou seja, caso numa garrafa de hemocultura existam microrganismos patogénicos estes devido ao seu metabolismo provocam a alteração do pH do meio e levam ao aumento do CO₂, o que provoca a alteração da cor do fundo das garrafas, como o aparelho faz leituras da cor em intervalos de tempo constantes (10 em 10 minutos), assim que é detetado uma alteração de cor o aparelho avisa que aquela garrafa de hemocultura é positiva.

Uma vez positiva é semeada em meios sólidos, é necessário ter em atenção se a garrafa é de aerobiose ou de anaerobiose, uma vez que, consoante o tipo de garrafa, estas são processadas de maneira diferente. Caso seja uma garrafa de aerobiose a sementeira é feita por quadrantes nos meios sólidos Gelose de Sangue e Gelose MacConkey, no caso de ser uma garrafa de anaerobiose a sementeira é feita por quadrantes em dois meios de Gelose de Sangue (um incuba atmosfera CO₂ e outro incuba atmosfera de anaerobiose de modo a investigar a presença de anaeróbios restritos) e Gelose MacConkey [21,44,58,59].



Figura 17: Exemplo de uma garrafa de hemocultura.



Figura 18: Equipamento *BACT/ALERT® 3D* (BioMérieux) usado no Laboratório de Microbiologia [59].

Para todas as hemoculturas é realizado um esfregaço para coloração de Gram, sendo que todos os passos que envolvem o processamento de uma garrafa de hemocultura no laboratório de microbiologia devem ser realizados dentro da câmara de fluxo laminar, de forma a manter o ambiente asséptico e evitar dessa forma possíveis contaminações, de salientar que antes de se retirar amostra do interior das garrafas de hemocultura para os meios sólidos deve ser feita a desinfecção da tampa [44,58].

4.3.5. Cateter

Um cateter é um dispositivo médico fino e flexível, que é frequentemente feito de plástico ou silicone, e que é inserido no corpo para diferentes finalidades médicas, sendo que existem diversos tipos de cateteres consoante a sua finalidade. Os cateteres tornam-se uma fonte infeção podendo levar a problemas graves para o paciente, sendo enviado para o laboratório para exame bacteriológico apenas nos casos onde há sinais de infeção relacionada com o cateter. Antes do cateter ser removido deve-se colher duas amostras de sangue para hemocultura (uma garrafa de aerobiose e uma garrafa de anaerobiose), a desinfecção da pele ao redor do cateter deve ser feita com recurso a um antisséptico, e o corte do cateter na porção terminal (entre e 3 a 5 cm) deve também ser feita assepticamente e colocado num contentor esterilizado. No caso de o cateter ser enviado para o laboratório sem as duas garrafas de hemocultura é rejeitado [21,60].

No laboratório o cateter é semeado no meio sólido Gelose de Sangue através da técnica semi-quantitativa de Maki [60].

4.3.6. Produtos em Zaragatoa

Os produtos colhidos em zaragatoas são fundamentais, uma vez que garantem a integridade e viabilidade dos microrganismos durante o transporte até ao laboratório [44].

4.3.6.1. Exsudado Vaginal e Uretral

Os exsudados vaginais e uretrais consistem em secreções da vagina e da uretra, respetivamente, que são obtidas por meio de uma zaragatoa estéril, que após a colheita é colocada num meio de transporte apropriado e enviada para análise no laboratório [44,61].

O exsudado vaginal é coletado com vista a várias finalidades, incluindo o diagnóstico de infeções vaginais tais como: vaginose bacteriana, candidíase vaginal e tricomoníase (causada por *Trichomonas vaginalis*) [44,61].

O exsudado uretral é coletado sobretudo nos homens para o diagnóstico de infeções sexualmente transmissíveis (IST) como a gonorreia e clamídia [44,61].

Na ULS Cova da Beira os exsudados vaginais são colhidos com recurso a uma zaragatoa de carvão ativado, sendo que quando este produto chega ao laboratório deve ser tratado muito rapidamente ou então ser conservado a 35° C. Para se realizar o exame citológico a zaragatoa de carvão deve ser incubada a 35° C durante 30 minutos, e posteriormente, ser pressionada contra uma lâmina para ser observada ao microscópio de modo a avaliar o número de células epiteliais, polimorfonucleares e *Trichomonas*. Para o exame cultural é realizada uma sementeira por quadrantes usando diretamente a zaragatoa, os meios sólidos usados são Gelose de Sangue, Gelose PolyVitex VCAT e Gelose Candida [61].

O exsudado uretral é processado da mesma forma que o exsudado vaginal [61].

4.3.6.2. Exsudado Nasal

O exsudado nasal é utilizado para a pesquisa de MRSA, que pode ser feita através do método cromogénico ou por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [62].

O método cromogénico consiste na colocação da zaragatoa nasal em meio líquido Todd-Hewitt, sendo este incubado durante 24h a 35° C, passadas as 24 horas é efetuada uma sementeira por quadrantes do meio líquido para o meio sólido cromogéneo Gelose

MRSA Através deste meio podemos avaliar a presença ou não de MRSA, pois caso este se encontre presente irão aparecer colónias verdes [62].

A pesquisa do MRSA por PCR é efetuada no aparelho GeneXpert, a zaragatoa nasal é colocada num reagente específico que depois é passado para um cartucho com os reagentes necessários para a deteção de MRSA, esse cartucho ao ser colocado no aparelho é executado a técnica de PCR e os resultados são passados automaticamente para o modulab [62].

4.3.6.3. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

A pesquisa de *Streptococcus agalactiae* é um exame de rotina realizado em todas as grávidas, seguidas pela consulta de obstetrícia, às 35 semanas de gestação. Este microrganismo é uma bactéria Gram Positiva que normalmente é assintomática nos adultos, porém, nos recém-nascidos pode levar a graves problemas de saúde, inclusive, pode levar à morte. Para a pesquisa é efetuada uma colheita de uma zaragatoa vaginal e outra retal. As zaragatoas quando chegam ao laboratório são ambas colocadas no mesmo meio líquido Todd-Hewitt, que é incubado durante 24h a 35° C, passadas as 24h de incubação é feita uma sementeira por quadrantes desse meio líquido para o meio sólido Gelose Granada e coloca-se uma lamela sobre o 1º quadrante da sementeira de modo a induzir ainda mais a anaerobiose nessa zona mais concentrada, o meio é incubado em atmosfera de anaerobiose [63].

Caso se encontre presente na amostra o *Streptococcus agalactiae* as colónias vão se apresentar de cor laranja [63].

4.3.6.4. Pesquisa de *Acinetobacter baumannii*

O *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria Gram-negativa oportunista responsável por causar uma variedade de infeções em seres humanos, particularmente em ambientes hospitalares, e apresenta uma vasta resistência a antibióticos o que torna o seu tratamento e eliminação bastante difícil [44].

A pesquisa do *Acinetobacter baumannii* é feito com recurso a uma zaragatoa retal, e quando este tipo de amostra chega ao laboratório o exame cultural é feito diretamente com a zaragatoa por quadrantes no meio Gelose MacConkey, e após ser feita a sementeira a zaragatoa é colocada em caldo de carne, caso não haja crescimento de colónias com morfologia de *Acinetobacter* no meio sólido, passadas as 24 horas, é

efetuado uma sementeira a partir do caldo de carne também para Gelose MacConkey [64].

4.3.7. Líquidos Biológicos

Os líquidos biológicos são fluidos encontrados no corpo humano e encontram-se envolvidos nas diversas funções fisiológicas e essenciais para o funcionamento adequado do organismo, estes líquidos caracterizam-se por serem estéreis, sendo que qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. Aquando da interpretação final do resultado, acerca do microrganismo encontrado, deve ser tida em conta o estado clínico atual do doente [44].

No laboratório de microbiologia são processados essencialmente os seguintes líquidos biológicos: líquido pleural, líquido ascítico, líquido pericárdico, líquido cefalorraquidiano, líquido articular/sinovial, pus e biopsias.

4.3.7.1. Líquido Pleural

O líquido pleural caracteriza-se por ser um fluido claro e límpido encontrado dentro da cavidade pleural (espaço entre as duas camadas que formam a membrana pleural que reveste os pulmões). Em condições normais a quantidade deste líquido é mínima, porém em situações de infeção, inflamação ou tumores há um acumular deste líquido, podendo levar a um derrame pleural [44,45].

Aquando da chegada deste líquido ao laboratório de microbiologia, este é semeado nos meios sólidos Gelose de Sangue, Gelose MacConkey e Gelose *Haemophilus* é também efetuado a passagem de 1 a 3 mL deste líquido para uma garrafa de hemocultura pediátrica que é incubada durante o período de até 5 dias no aparelho *BACT/ALERT*® *3D*, caso este detete a mudança de cor do fundo da garrafa, vai identificá-la como positiva. Caso não seja possível colocar o líquido na garrafa de hemocultura, este deve ser colocado em caldo de carne, duas a três gotas, que de seguida é incubado durante 24h a 48h a 35° C, ao fim desse período de tempo se o caldo de carne se encontrar turvo, deve-se fazer novamente a sementeira, a partir do caldo de carne, para os mesmos meios sólidos que anteriormente. São também preparadas duas lâminas pela técnica de citospin, para posterior coloração de Gram e Ziehl-Neelsen [65].

4.3.7.2. Líquido Ascítico

O líquido ascítico caracteriza-se por ser um fluido claro, límpido e amarelo encontrado na cavidade abdominal, mais propriamente na cavidade peritoneal. Este líquido é

produzido como parte do processo normal de equilíbrio de fluidos do corpo humano, porém o seu acúmulo em excesso é característico de um distúrbio chamado ascite, que pode ser causada por uma variedade de condições médicas [44,45].

Quando este tipo de líquido biológico chega ao laboratório de microbiologia deve-se colocar sempre o produto numa garrafa de hemocultura pediátrica que é incubada no aparelho *BACT/ALERT*® 3D, caso a garrafa positive deve ser feita a sementeira nos meios Gelose de Sangue e Gelose MacConkey [65].

Caso seja pedido para separar uma alíquota para a pesquisa de Micobactérias é necessário centrifugar a amostra durante 10 minutos a 2000 rpm num frasco de centrifugação de 50 mL e posteriormente enviado para o devido setor. São também preparadas duas lâminas pela técnica de citospin, para posterior coloração de Gram e Ziehl-Neelsen [65].

4.3.7.3. Líquido Pericárdico

O líquido pericárdico caracteriza-se por ser um fluido claro e límpido encontrado dentro do espaço pericárdico, que corresponde à cavidade entre as duas camadas do pericárdio, este líquido desempenha várias funções importantes no que toca ao funcionamento adequado do coração tais como: lubrificação, redução do atrito e proteção. Em condições normais a quantidade de líquido pericárdico presente na cavidade é mínima, variando entre os 15 e 50 µL, porém em certas condições médicas, como é o caso da pericardite (inflamação do pericárdio) pode haver um aumento da quantidade de líquido pericárdico na cavidade [44,45].

Aquando da chegada deste tipo de produto ao laboratório de microbiologia para ser processado, este deve ser primeiramente concentrado com recurso a centrifugação (10 minutos a 2000 rpm) rejeitando-se o sobrenadante e trabalhando apenas com o sedimento [67].

Relativamente ao exame cultural a sementeira é realizada por quadrantes em Gelose de Sangue, Gelose *Haemophilus* e Gelose MacConkey. Para este tipo de líquido também é preparada uma garrafa de hemocultura pediátrica que incuba durante um período de até 5 dias no aparelho *BACT/ALERT*® 3D, caso não seja possível colocar o líquido na garrafa de hemocultura pediátrica deve-se passar duas a três gotas para caldo de carne que incuba durante 24h a 48h a 35° C, caso ao fim desse período o caldo se encontre turvo deve ser feita uma nova sementeira, a partir do caldo de carne, para os mesmos

meios sólidos anteriores. São também preparadas duas lâminas pela técnica de citospin, para posterior coloração de Gram e Ziehl-Neelsen [67].

4.3.7.4. Líquido Cefalorraquidiano

O LCR apresenta-se como um líquido claro e incolor que circula no espaço subaracnoídeo do sistema nervoso central e está envolvido em várias funções importantes para o funcionamento adequado do sistema nervoso, entre elas: proteção, flutuação (ajuda a manter o cérebro suspenso dentro do crânio), fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos. Após ser colhido este tipo de amostra deve ser imediatamente enviado para o laboratório, pois é considerado a amostra mais importante do laboratório e é processado mal chega, deve ser mantido à temperatura ambiente ou na estufa a 35° C, nunca deve ser refrigerado antes do processamento [44,45].

O exame citológico é realizado na camara de contagem Nageotte, no que diz respeito ao exame cultural a sementeira é sempre efetuada na camara de fluxo laminar e é feita nos meios sólidos Gelose de Sangue que incuba durante um período de até 4 dias a 35° em atmosfera de CO₂, Gelose Chocolate PVX que incuba durante um período de até 4 dias a 35° C em atmosfera CO₂, Gelose MacConkey que incuba durante um período de até 4 dias a 35° C e Gelose Sabouraud que incuba durante um período de até 4 dias a 30° C, a cada 24h os meios sólidos são examinados de forma a avaliar o crescimento de colônias, caso não se verifique o crescimento os meios são incubados mais 24h até fazer os 4 dias. Tal como os outros líquidos biológicos este também é colocado numa garrafa de hemocultura pediátrica que incuba no aparelho *BACT/ALERT*® 3D e caso não seja possível colocar na garrafa de hemocultura deve-se passar duas ou três gotas para caldo de carne que incuba durante 48h a 35° C, caso o caldo de carne fique turvo deve ser efetuada nova sementeira, a partir do caldo de carne para os mesmos meios sólidos que anteriormente. O LCR também é semeado no meio líquido Lowenstein-Jensen para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, para além de também serem preparadas duas lâminas pela técnica de citospin, para posterior coloração de Gram e Ziehl-Neelsen [66].

4.3.7.5. Líquido Articular/Sinovial

O líquido articular/sinovial caracteriza-se por ser um fluido transparente e viscoso encontrado dentro das articulações, este desempenha diversas funções importantes tais como: Lubrificação, amortecimento, nutrição e remoção de resíduos [68].

Aquando da chegada deste tipo de líquido ao laboratório este deve ser primeiramente concentrado por centrifugação (10 minutos a 2000 rpm) antes de ser processado, é descartado o sobrenadante e processado apenas o sedimento. O exame cultural passa pela sementeira por quadrantes nos meios sólidos Gelose de Sangue, Gelose Chocolate PVX, Gelose MacConkey e Gelose Sabouraud [68].

Assim como os outros líquidos biológicos, também é colocado numa garrafa de hemocultura pediátrica e caso não seja possível é colocado em caldo de carne. São também preparadas duas lâminas pela técnica de citospin, para posterior coloração de Gram e Ziehl-Neelsen [68].

4.3.7.6. Pus

O pus caracteriza-se por ser uma substância espessa e com uma cor amarelada-esverdeada, composta por células mortas, tecido danificado, bactérias mortas e outros detritos celulares, por norma este tipo de líquido biológico encontra-se associado a infeções bacterianas e é produzido pelo corpo em reposta à atuação do sistema imunológico contra a infeção [44,45].

A amostra após ser colhida pode ser enviada para o laboratório de diferentes maneiras, pode ser enviada através do meio de portagerme ou em zaragatoa (2 zaragatoas por norma). Dependendo do tipo contentor onde o pus é enviado ele é processado de maneira diferente. No caso do laboratório receber o pus no meio de portagerme é primeiramente necessário verificar se a anaerobiose se mantém, esta visualização é possível através da alteração da cor do meio, que fica azul em caso de contacto com o oxigénio, antes de se processar a amostra no portagerme deve-se desinfetar a tampa com álcool a 70%, para retirar a amostra é usada uma seringa esterilizada e coloca-se uma gota nos meios sólidos a serem usados e na lâmina que vai ser usada para a coloração de Gram. No exame cultural é feita a sementeira em dois meios sólidos Gelose de Sangue um incuba durante 24h a 35° C em atmosfera de CO₂ e o outro em atmosfera de anaerobiose, Gelose MacConkey que incuba durante 24h a 35° C e Gelose Candida que incuba durante 24h a 30°C [69].

No caso de o laboratório receber a amostra de pus em zaragatoa, quer o exame cultural como a lâmina usada para a coloração são feitas diretamente com a zaragatoa [69].

4.3.7.7. Biopsia

Uma biópsia consiste num procedimento médico realizado de modo a obter uma amostra de tecido corporal para análise laboratorial, esta amostra de tecido pode ser

obtida de qualquer parte do corpo, incluindo órgãos e outras estruturas. O objetivo principal das biópsias é o diagnóstico de doenças, anormalidades celulares e a avaliação da extensão de uma dada condição médica [44,45].

A colheita do produto é feita após uma prévia desinfecção cirúrgica do local, sendo este colocado num recipiente próprio e esterilizado (ProbeAX), esse recipiente contém 10 esferas de aço inoxidável e 5 mL de solução salina fisiológica, que ajudam na desintegração da biópsia para melhor avaliação nos procedimentos laboratoriais [70].

Após a biópsia ser esmagada esta é semeada por quadrantes nos meios sólidos Gelose de Sangue, Gelose MacConkey e também é colocado em caldo de carne, caso ao fim de 48h o caldo se encontrar turvo é feita uma nova sementeira por quadrantes, diretamente do caldo, para os mesmos meios sólidos referidos anteriormente. Para o exame microscópico é preparada uma lâmina que posteriormente é corada pela coloração de Gram [70].

4.4. Análise Microscópica

A análise microscópica é utilizada no laboratório de microbiologia para identificar células bacterianas, elementos fúngicos, parasitas e aglomerados de vírus presentes em células infetadas. Deste modo são efetuados dois tipos diferentes de coloração, sendo elas a coloração de Gram, cujo objetivo é diferenciar as bactérias Gram Positivas das bactérias Gram Negativas, e a coloração de Ziehl-Neelsen, cujo objetivo é identificar a presença de B.A.A.R na amostra [45,71,72].

De salientar que para o caso da análise microscópica de elementos fúngicos e leveduras, é efetuado um fresco, onde é colocado uma gota de soro fisiológico numa lâmina, uma colónia suspeita é picada e é efetuado o esfregaço na lâmina com o soro fisiológico, por fim é colocado uma lamela e feita a visualização ao microscópio [45,71,72].

4.4.1. Coloração de Gram

No laboratório de microbiologia a coloração de Gram é efetuada de forma automatizada com recurso ao equipamento *PREVI® Color Gram (BioMérieux)* (Figura 19), desta forma são garantidos resultados precisos e padronizados, pois este equipamento possui bicos de pulverização que dispensam os reagentes de um modo constante, evitando a contaminação e oferecendo uma melhor distinção entre as diferentes bactérias quando comparadas pela mesma coloração feita manualmente [73].

Através deste método de coloração é nos permitido distinguir dois grupos de bactérias: as bactérias capazes de reter o violeta de cristal (Bactérias Gram Positivas - Figura 20A) daquelas que não conseguem reter o violeta de cristal e que o libertam durante o processo de lavagem com álcool/acetona (Bactérias Gram Negativas – Figura 20B). Esta distinção é resultado da diferença de parede celular e da permeabilidade da membrana de cada um destes grupos [45,71,72].

As bactérias Gram Negativas caracterizam-se por apresentar uma membrana externa e uma parede celular composta por uma camada fina de peptidoglicano, por esta razão este tipo de bactérias não é capaz de reter o violeta de cristal ficando coradas de rosa-avermelhado. As bactérias Gram Positivas, ao contrário das bactérias Gram Negativas, não apresentam uma membrana externa e apresentam uma parede celular composta por uma camada espessa de peptidoglicanos, por esta razão este tipo de bactérias é capaz de reter o violeta de cristal ficando coradas de azul-roxo [45,71,72].



Figura 19: Equipamento *PREVT*[®] *Color Gram* usado no Laboratório de Microbiologia [73].

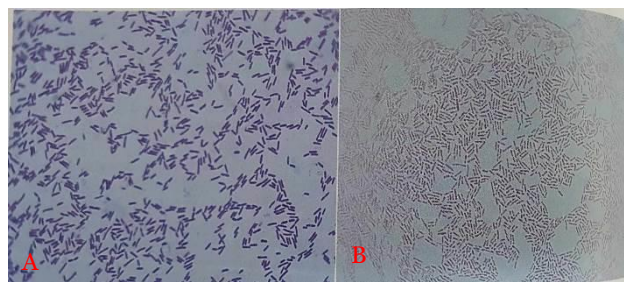


Figura 20: (A) - Bactérias Gram Positivas coradas de azul/roxo. (B) - Bactérias Gram Negativas coradas de rosa [45].

4.4.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

No laboratório de microbiologia a coloração de Ziehl-Neelsen é efetuada de forma automatizada com recurso ao equipamento *Aerospray*[®] *TB Slide Stainer / Cyto centrifuge* (Figura 21), desta forma, assim como na coloração de Gram, são garantidos resultados precisos e padronizados [74].

Quando comparada com a coloração de Gram, este tipo de coloração é bastante mais agressivo, e tem como alvo primário as bactérias cujas paredes celulares apresentem na sua composição ácidos gordos de cadeia longa (ácidos micólicos), a presença destes dão à bactéria resistência ao processo de descoloração. Desta forma, este tipo de coloração é

bastante útil na identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (B.A.A.R), como é o caso do *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela tuberculose [45,71,72].

A coloração de Ziehl-Neelsen utiliza calor e fenol para promover a penetração da fucsina nas células, tendo esta penetrado nas células, como o caso do *M. tuberculosis*, este não é facilmente removido durante o processo de descoloração, e, portanto, é considerado álcool-ácido resistente, mantendo-se a cor rosa no final da coloração (Figura 22A). As bactérias que não são álcool-ácido resistentes são descoradas durante o processo de descoloração, ficando no final coradas a azul (Figura 22B) [45,71,72].



Figura 21: Equipamento *Aerospray® TB Slide Stainer / Cytocentrifuge* usado no Laboratório de Microbiologia [74].

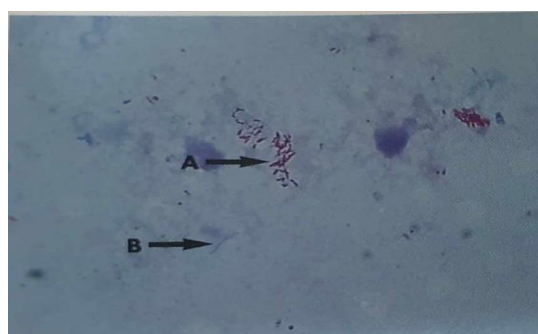


Figura 22: (A) – Bacilos álcool-ácido resistentes corados de rosa. (B) – Bacilos álcool-ácido não resistentes corados de azul [45].

4.5. Testes de Identificação e Sensibilidade aos Antibióticos

4.5.1. Testes Manuais

Os testes manuais efetuados no laboratório são testes baseados nas características fenotípicas dos microrganismos, podendo, a partir dessas características e das interações com determinados reagentes e compostos (optoquina e novobiocina), ser feita uma identificação preliminar do microrganismo, que posteriormente, com recurso aos testes automáticos é confirmada [45,89].

4.5.1.1. Teste da Catalase

A catalase é uma enzima que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 , a sua presença é confirmada através da análise direta numa cultura bacteriana, pois quando a colónia é colocada em contacto com uma solução de H_2O_2 ocorre a libertação de bolhas (O_2) que causa efervescência. Nestes casos, onde há produção de efervescência, temos um

resultado positivo (catálase positiva), nos casos onde não há produção ou quando a produção de efervescência é fraca consideramos que temos um resultado negativo (catálase negativa) [44,45,89].

Este teste é bastante útil para a identificação de bactérias Gram Positivas. Caso estejamos perante um teste de catálase positivo estamos na presença de um *Staphylococcus*, caso o teste da catálase seja negativo estamos na presença de um *Streptococcus* ou de *Enterococcus* [44,45,89].

4.5.1.2. Teste da Coagulase

O teste da coagulase permite detetar a presença da enzima coagulase, esta enzima é produzida por alguns microrganismos e promove a coagulação do plasma. A sua presença é confirmada através da análise direta numa cultura bacteriana, quando a colónia é colocada em contacto com uma solução de plasma de coelho com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e agitada durante 15 a 30 segundo, caso a enzima coagulase esteja presente, esta vai levar à ativação da protrombina, resultando na formação de trombina, que é responsável por catalisar a ativação do fibrinogénio, este leva à formação de um coágulo de fibrina, portanto, quando há a formação de um coágulo de fibrina estamos perante um caso de coagulase positiva, caso não se forme nenhum coagulo estamos perante um caso de coagulase negativa [44,45,89].

A partir deste teste é possível distinguir os *Staphylococcus* coagulase negativo, como são os casos do *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, dos *Staphylococcus* coagulase positivo como é o caso do *S. aureus* [44,45,89].

De salientar que este teste serve apenas para identificar o grupo *Staphylococcus*, portanto, este teste é apenas feito se anteriormente o teste da catálase for positivo [89].

4.5.1.3. Teste da Oxidase

O teste da oxidase permite detetar a presença do citocromo c oxidase, este participa no transporte de eletrões e nas vias metabólicas do nitrato das bactérias, a sua presença é confirmada através do esmagamento de uma colónia contra um filtro de papel que contem um reagente específico (tetrametil-*p*-fenilenediamina dicloridrato 1%), e caso a colónia contenha o citocromo c oxidase presente, o filtro de papel fica de uma cor roxa devido à interação com o oxigénio, e nesses casos temos um teste de oxidase positivo, caso o filtro fique de uma cor rosa temos um teste de oxidase negativo [44,45,89].

Este teste é realizado apenas em bactérias Gram Negativas e permite distinguir algumas destas bactérias, tais como: *Neisseria*, *Moraxella* e *Pseudomonas spp* (oxidase positivas), *Acinetobacter spp.* e *Enterobacterales* (oxidase negativo) [44,45,89].

4.5.1.4. Teste da Urease

O teste da urease permite detetar a presença da enzima urease que é responsável por catalisar a hidrólise da ureia em CO₂ e amónia (NH₃). O teste é realizado através de uma inoculação de uma colónia do microrganismo num meio de cultura contendo ureia e um indicador de pH, a ureia quando é hidrolisada leva à acumulação da amónia no meio, tornando este alcalino, isto leva ao aumento do pH o que causa a mudança de cor no indicador de amarelo para rosa, quando ocorre esta mudança de cor estamos perante um caso de urease positiva, caso não haja alteração de cor estamos perante um caso de urease negativa [44,45,89].

Este teste é utilizado para distinguir bactérias que possuem a capacidade de metabolizar a ureia tais como: *Proteus*, *Helicobacter pylori* e *Klebsiella pneumoniae* (urease positiva) de *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (urease negativa) [44,45,89].

4.5.1.5. Teste da Optoquina

A optoquina é um fármaco solúvel em água que se difunde rapidamente pelo meio de cultura sólido, para tal, este teste utiliza um disco de 5 µg de optoquina que é colocado no centro de uma placa Gelose de Sangue inoculada com o microrganismo em estudo. A optoquina é usada para testar a sensibilidade do *Streptococcus pneumoniae*, uma vez que este *Streptococcus* é o único que é sensível à optoquina. O meio Gelose de Sangue é incubado durante 24h a 35° C em atmosfera de CO₂, a interpretação é feita através da observação da formação de um halo característico (≥ 19mm) em redor do disco de optoquina, se o halo for igual ou superior a 19mm significa que estamos perante um caso de *Streptococcus pneumoniae*, se o halo for inferior ou inexistente estamos perante outro tipo de *Streptococcus spp.* [44,45,89].

4.5.1.6. Teste da Novobiocina

A novobiocina é um fármaco utilizado da mesma forma que a optoquina, porém, o teste da novobiocina é usado para diferenciar o *Staphylococcus saprophyticus* (resistente) do *Staphylococcus epidermidis* (sensível). Para tal é usado um disco de 5 µg de novobiocina que é colocado no centro de uma placa Muller-Hinton inoculada com o

microrganismo em estudo. O meio Muller-Hinton é incubado durante 24h a 35° C e a interpretação é feita da seguinte forma, se após as 24h estivermos na presença de um halo maior que 16 mm significa que a espécie de *Staphylococcus* é sensível à novobiocina, portanto estamos na presença de *S. epidermidis*, se o halo for inexistente ou inferior ou igual a 16 mm estamos na presença de *S. saprophyticus* [44,45,89].

4.5.1.7. Tipagem

Para efetuar a tipagem é utilizado um kit específico (*PathoDX™ Strep Grouping Kit* da *Thermo Scientific™*) cujo objetivo é diferenciar os *Streptococcus β-hemolíticos* através da classificação de Lancefield. Para o processamento da amostra devemos apenas usar colónias estreptocócicas beta-hemolíticas presentes em Gelose de Sangue. O kit contém IgG específica para os diferentes tipos de *Streptococcus β-hemolíticos*, estas IgG encontram-se acopladas às diferentes zonas de teste e caso o *Streptococcus* contenha o antigénio específico na sua parede celular vai dar-se a aglutinação deste com a IgG específica, permitindo assim ser feita a diferenciação [90].

4.5.1.8. Teste rápido para pesquisa de *Staphylococcus aureus* metilina resistente

Este teste rápido é efetuado quando estamos na presença de *S. aureus* e queremos verificar se este é ou não resistente à metilina. Após ter sido feito o teste da catalase e da coagulase, se ambos forem positivos, é então feito este teste de pesquisa de MRSA, porém deve ser sempre feito uma inoculação para meio cromogéneo MRSA para analisar o crescimento das colónias e a sua coloração, de modo a confirmar o resultado do teste. A resistência à metilina é causada pela presença do gene *mecA* (ou *mecC*) no genoma do *S. aureus*, este gene codifica para uma proteína que se liga à *Penicillin Binding Protein* (PBP2a), que se encontra presente na parede celular do *S. aureus*, esta proteína codificada pelo gene *mecA* tem baixa afinidade para as penicilinas sintéticas, como é o caso da metilina, por esta razão a metilina não consegue atuar na parede celular do *S. aureus* de modo a levar à perda da integridade estrutural, originando assim a resistência a este antibiótico [44,45,91].

Para a realização deste teste é usado um kit especial (*Clarview™ PBP2a SA Culture Colony Test* da *Abbott*) que contém dois reagentes específicos e uma tira de teste. Duas gotas do reagente um são colocadas num tubo de teste e uma colónia suspeita é retirada com recurso a uma ansa calibrada de 1 µL, esta colónia é então posta em contacto com o reagente um e misturada, posteriormente são adicionadas duas gotas do reagente dois e a mistura é levada ao vortex, por fim é adicionada a fita de teste, ao

fim de 5 minutos a fita é analisada e se forem visíveis duas linhas vermelhas (uma na zona de teste e outra na zona de controlo) estamos perante um caso de MRSA, portanto o gene *mecA* está presente, caso apenas seja visível uma linha vermelha na zona de controlo estamos perante um caso de MSSA o que significa que o gene *mecA* não está presente [91].

4.5.1.9. ETEST®

Este tipo de teste de sensibilidade aos antibióticos é efetuado quando as cartas usadas no antibiograma têm informação insuficiente, então de modo a colmatar essa falta de informação, que ocorre pela necessidade de as cartas usadas pelo laboratório serem atualizadas, são usadas tiras ETEST® (*BioMérieux*). As tiras ETEST® contêm concentrações crescentes do antibiótico/antifúngico e são usadas para determinar a concentração mínima inibitória. Para realizar este tipo de teste de sensibilidade basta aplicar uma tira ETEST® a uma placa de gelose inoculada, o tipo de gelose usada vai depender do tipo de microrganismo que foi identificado previamente, após incubação ira formar-se uma elipse em redor da tira ETEST® permitindo-nos ver, através da escala de concentrações, qual é a concentração mínima inibitória [45,82,92].

4.5.2. Testes Automáticos

No laboratório de microbiologia grande parte dos microrganismos isolados são identificados através do equipamento *VITEK®2 COMPACT* (*BioMérieux*) (Figura 23), este equipamento é automatizado e para além da identificação do microrganismo também é capaz de realizar o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA). Este equipamento permite uma rápida identificação do microrganismo e contribui também com os TSA que ajudam o clínico a escolher a melhor opção terapêutica para aquele caso em específico, uma vez que o mesmo microrganismo, em casos diferentes, pode ter sensibilidades diferentes aos mesmos antibióticos [93].

O *VITEK®2 COMPACT* utiliza cartas de identificação (Tabela 13), que são constituídas por poços com diferentes substratos bioquímicos onde é medida a atividade metabólica, através da interpretação automática das diferentes atividades metabólicas é possível identificar e diferenciar os diferentes microrganismos. Como referido anteriormente o *VITEK®2 COMPACT* também é capaz de realizar TSA, sendo que para tal são usadas cartas de antibiograma específicas para o microrganismo identificado (Tabela 14), estas cartas contêm diferentes concentrações de antibióticos liofilizados em cada poço [93-95].

Tabela 13: Cartas de Identificação disponíveis no laboratório de microbiologia.

GN	ID de bactérias Gram Negativas (fermentadoras e não fermentadoras de lactose)
GP	ID de bactérias Gram Positivas
NH	ID de <i>Neisseria spp.</i> , <i>Haemophilus spp.</i> e outras bactérias Gram Negativas fastidiosas
YST	ID de leveduras e microrganismos similares
ANC	ID de bactérias anaeróbias e bactérias corineformes

Tabela 14: Cartas de TSA disponíveis no laboratório de microbiologia.

AST ST03	Antibiograma de <i>Streptococcus spp.</i>
AST N355	Antibiograma de Bacilos Gram Negativos
AST YS08	Antibiograma de Fungos
AST N427	Antibiograma de Bacilos Gram Negativos de relevância clínica contra antibióticos específicos
AST P586	Antibiograma de <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> com catalase negativa
AST P648	Antibiograma de <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> com catalase positiva
AST XN22	Antibiograma de Bacilos Gram Negativos

De modo que todo o processo seja padronizado, o inóculo é colocado numa suspensão salina, suspensão essa que é aspirada pelo equipamento para os poços presentes nas cartas, a suspensão é preparada seguindo a escala de MacFarland, ou seja, a suspensão deve ter densidade ótica de acordo com as características do microrganismo em estudo (Tabela 15) [93-95].

Tabela 15: Densidades óticas da suspensão salina.

Microrganismo	Densidade ótica
Leveduras	0.55-0.70
Haemophilus	2.8-3.3
Streptococcus / Enterococcus	0.55-0.70
Outros	0.55-0.65



Figura 23: Equipamento VITEK®2 COMPACT usado no Laboratório de Microbiologia e cartas usadas para identificação e sensibilidade aos antibióticos [93]

4.6. Testes Serológicos

Os testes serológicos podem ser definidos como o estudo do soro, com o intuito de pesquisar agentes causadores de doenças transmitidas através do sangue. Estes testes são realizados para confirmar ou pesquisar certas infeções causadas por bactérias, fungos e vírus [82].

No laboratório de microbiologia são realizados quatro testes serológicos: teste rosa bengala, teste wright, teste widal e teste VDRL e RPR (*rapid plasma reagin*).

4.6.1. Teste Rosa Bengala

Este teste consiste num teste de aglutinação para a pesquisa de *Brucella spp.*, agente causador de bruceloses. O teste consiste numa reação rápida de aglutinação, por deteção de IgG, que usa uma suspensão conhecida com antigénios de *Brucella spp.*, corada de Rosa Bengala em meio ácido tamponado, aquando da mistura com o soro, caso se observe o aparecimento de aglutinados corados, significa que estamos perante um caso de brucelose positiva. Caso não se formem aglutinados, estamos perante um caso de brucelose negativa [83,84].

Apesar de este teste ser muito sensível, é um teste qualitativo, o que significa que em casos de brucelose positiva, é necessário realizar o teste de Wright.

4.6.2. Teste Wright

Este teste quantitativo é utilizado para confirmar os diagnósticos de brucelose. Este teste consiste numa reação de aglutinação de anticorpos com antigénios do tipo O (somático), onde é utilizado uma suspensão conhecida com antigénios de *Brucella spp.* inativados por formol e calor. Um resultado superior ou igual a 120 U.I./mL indica a

presença de uma brucelose ativa. De salientar que este teste se torna positivo muito rapidamente nos casos de brucelose aguda, mas passa rapidamente a negativo por detecção das IgM, é necessário ter bastante atenção a estes casos e deve-se realizar novamente este teste passados mais alguns dias [85,86].

4.6.3. Teste Widal

O teste de Widal consiste num teste de aglutinação utilizado para o diagnóstico de febre tifóide ou paraifoide causados por *Salmonella spp.*, neste teste é usado uma suspensão conhecida com antígenos O (somático) e H (flagelar) da *Salmonella spp.*, aquando da interação entre o soro do paciente e os antígenos O e H, caso haja aglutinação anticorpo-antígeno para estes dois tipos de antígenos estamos perante um caso positivo [85,86].

4.6.4. Rapid Plasma Reagin e Venereal Disease Research Laboratory

Os testes RPR (*Rapid Plasma Reagin*) e VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) são realizados com o objetivo de diagnosticar sífilis. A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada pelo *Treponema pallidum*. O RPR consiste numa reação antígeno-anticorpo onde ocorre uma aglutinação entre o antígeno cardiolipina com o anticorpo reagina (anticorpo não-treponema) presentes em pacientes positivos. O VDRL consiste no estudo laboratorial de doenças venéreas que se baseia no princípio do RPR, mas para a pesquisa da neuro-sífilis no LCR [87,88].

4.7. Testes Biologia Molecular

Os testes de biologia molecular realizados no SPC são efetuados com recurso ao equipamento *GeneXpert*[®]. Este equipamento automatizado é fabricado pela *Cepheid* e utiliza a técnica PCR [76].

A técnica de PCR consiste numa técnica de amplificação de pequenas amostras de DNA/RNA alvo, produzindo, a partir dessa pequena amostra, milhões de cópias. O processo de amplificação envolve uma serie de ciclos de aquecimento e arrefecimento da amostra, utiliza primers específicos (pequenos segmentos de DNA complementares à sequência alvo), nucleotídeos (unidade de construção do DNA/RNA) e a enzima DNA-polimerase [45,75,82].

O processo de PCR é dividido em três etapas que são repetidas durante vários ciclos, essas etapas são:

1º - **Desnaturação:** A mistura contendo o DNA/RNA alvo é aquecido a uma temperatura alta (entre 90º a 95ºC), este aquecimento leva à quebra das pontes de hidrogénio entre as duas cadeias de DNA originando uma cadeia simples.

2º - **Annealing:** A temperatura é reduzida (entre 50º a 60º C) de modo a permitir que os primers específicos se liguem às sequências complementares de DNA/RNA. A enzima DNA polimerase entra em ação e junta-se aos primers e inicia a síntese de novas cadeias de DNA/RNA utilizando os nucleótidos presentes na mistura.

3º - **Elongação:** A temperatura é novamente aumentada (entre 70º a 72º C) para permitir a ação continua da DNA polimerase, isto resulta na duplicação do fragmento de DNA ou RNA alvo.

Estas três etapas são repetidas durante múltiplos ciclos, fazendo com que o número de cópias aumente exponencialmente [45,75,82].

O equipamento *GeneXpert*® (Figura 24) realiza estes ciclos de forma automatizada, sendo apenas necessário preparar a amostra, para a preparação da amostra é necessário misturá-la com o tampão de inativação, após esse passo uma certa quantidade da mistura é pipetada para um cartucho, esse cartucho é específico para os diferentes tipos de amostras e tem em conta o que se pretende detetar por biologia molecular, os cartuchos já vêm incorporados com os primers, nucleótidos e com a enzima (Figura 24). Após a mistura ser pipetada para o cartucho, este é introduzido no equipamento, sendo necessário identificar o cartucho e o código de barras do paciente com recurso a um leitor de barras, esta correlação entre o cartucho e o código de barras do paciente é necessária para que possa ser feita a passagem automática dos resultados para o *Modulab* [77].

Os testes de biologia molecular utilizados pelo laboratório de microbiologia são: Teste *Xpert*® MTB/RIF, Teste *Xpert*® Carba-R, Teste *Xpert*® MRSA NxG e Teste *Xpert*® CT/NG.

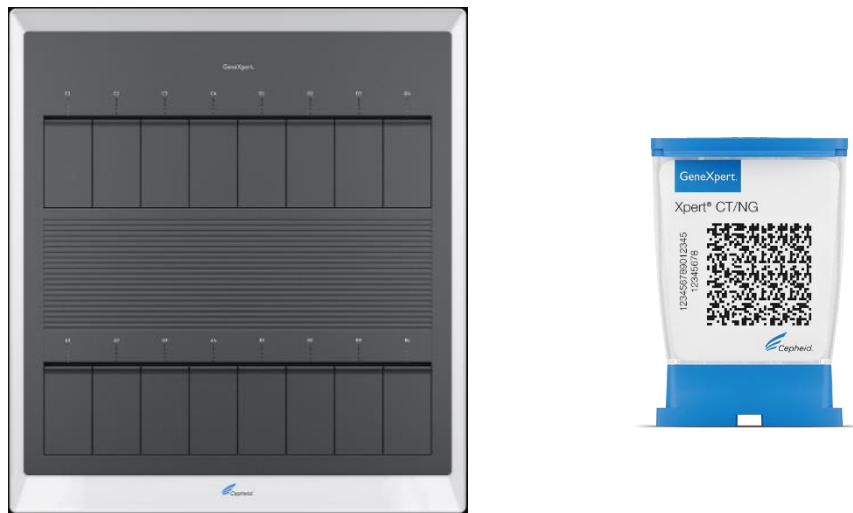


Figura 24: Equipamento *GeneXpert*® usado no SPC e um exemplo de um cartucho usado pelo equipamento [76].

4.7.1. Teste Xpert® MTB/RIF

Este teste tem como objetivo a detecção do *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina. O *M. tuberculosis* caracteriza-se por ser extremamente contagioso, o que faz com que milhões de pessoas sejam afetadas por todo o mundo. O teste Xpert® MTB/RIF surge em resposta às dificuldades de outros métodos de detecção e identifica a presença de DNA de *M. tuberculosis* em amostras de expetoração, é também possível detetar mutações no gene *rpoB* que confere a resistência ao antibiótico rifampicina, antibiótico usado no tratamento deste tipo de problema [78].

4.7.2. Teste Xpert® Carba-R

Este teste tem como objetivo a detecção de bactérias Gram Negativas resistentes aos carbapenemos. Bactérias como o caso da *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter spp* são produtores de carbapenemases, torando-se desta forma, resistentes a todos os agentes beta-lacâmicos, incluindo os carbapenemos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem). O teste Xpert® Carba-R tem a capacidade de detetar e diferenciar vários genes associados à resistência aos carbapenemos através de amostras provenientes de zaragatoas retais, entre os vários genes temos: KPC, NDM, VIM, IMP-1, OXA-48, OXA-181 e OXA- 232 [79].

4.7.3. Teste Xpert® MRSA NxG

Este teste tem como o objetivo a detenção de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), a meticilina é uma penicilina sintética utilizada na terapêutica de casos de infeções por

S. aureus, porém, ao longo dos anos, esse adquiriu mecanismos de resistência, que o protegem da ação deste tipo de antibiótico, mais propriamente a aquisição do gene *mecA* (ou *mecC*) ao seu genoma proporcionou ao *S. aureus* a resistência à metilina. O teste Xpert® MRSA NxG é capaz de fazer uma detecção rápida da presença de MRSA em amostras de zaragatoas nasais [80].

4.7.4. Teste Xpert® CT/NG

Este teste tem como objetivo a detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, estas bactérias Gram Negativas estão associadas a doenças sexualmente transmissíveis, sendo elas das mais prevalentes a nível mundial, mas são tratáveis, caso não sejam tratadas podem levar a complicações mais severas, tais como: infertilidade, doença inflamatória pélvica e complicações durante a gravidez. O teste Xpert® CT/NG é capaz de detetar e diferenciar estes dois tipos de bactérias Gram Negativas a partir de amostras de indivíduos assintomáticos e/ou sintomáticos. As amostras recebidas podem ser amostras de urina, zaragatoa vaginal e zaragatoa endocervical [81].

5. Laboratório de Hematologia

O laboratório de Hematologia é uma das secções de diagnóstico o SPC da ULS Cova da Beira, esta é responsável pelo estudo das células sanguíneas e da coagulação, de modo a ser possível diagnosticar e monitorizar patologias associadas ao sangue [82].

Nesta secção efetuam-se: hemogramas completos; testes de hemostasia; análise da velocidade de sedimentação eritrocitária (VS); contagem de reticulócitos; contagem total e diferencial de células em líquidos biológicos (ascítico, pleural, peritoneal, entre outros); esfregaços de sangue periférico e/ou medula óssea para contagem dos elementos celulares e imunofenotipagem por citometria de fluxo.

A maior parte das amostras processadas no laboratório de hematologia são amostras de sangue total, que são colhidas em tubos com EDTA e processadas diretamente nos aparelhos automatizados sem centrifugação da amostra. Para a análise dos parâmetros de coagulação, o sangue é colhido para um tubo com citrato de sódio, que posteriormente é centrifugado e o plasma é usado para avaliar os parâmetros de coagulação. Para além das amostras de sangue o laboratório de hematologia também processa líquidos biológicos e urinas, sendo estes processados em menor número comparativamente com as amostras de sangue [21].

No início de cada dia são passados controlos internos em todos os equipamentos automatizados utilizados na secção, com vista a garantir que os resultados das amostras dos utentes, analisadas pelos equipamentos, são válidos, sendo também efetuadas as manutenções e lavagens necessárias para a boa execução do equipamento, de modo a minimizar os possíveis erros mecânicos que possam acontecer [21].

5.1. Hematopoiese

A hematopoiese (Figura 25) corresponde ao processo através do qual o organismo é capaz de produzir os diferentes tipos de células sanguíneas, a partir de um precursor comum (células estaminais hematopoiéticas pluripotentes). Este processo ocorre na medula óssea, onde as células estaminais pluripotentes se dividem através de mitoses originando uma célula filha pluripotente e uma célula progenitora, que após processos de divisão e diferenciação formam os eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, plaquetas, linfócitos B, linfócitos T e células *Natural-Killer* (NK) [82] [101].

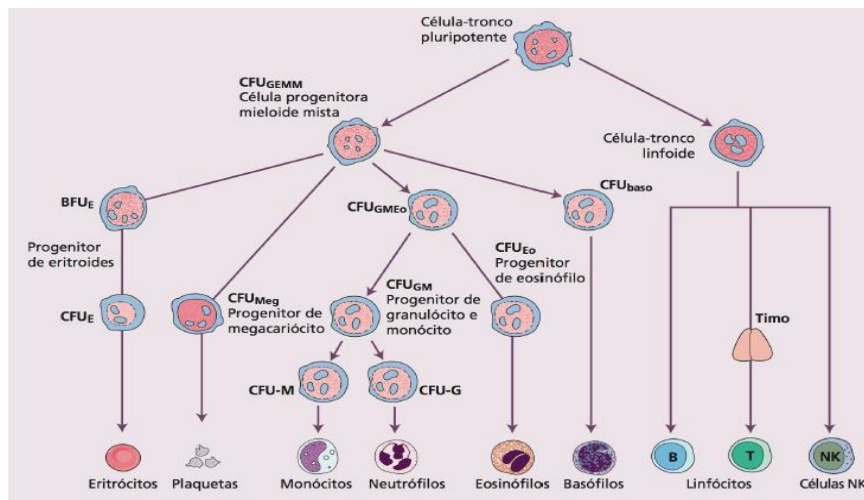


Figura 25: Processo Hematopoiético [101].

As células estaminais hematopoiéticas (HSC) têm 3 características importantes: são capazes de se diferenciar em progenitores de todas as linhagens sanguíneas; têm uma alta capacidade proliferativa; e são capazes de se autorrenovar o que permite manter o reservatório de HSC, uma vez que a hematopoiese é um processo contínuo. Tendo em conta os vários tipos de células sanguíneas que são produzidas durante a hematopoiese, podemos dividi-la em 5 fases, dependendo do tipo de célula sanguínea produzida [82,101]:

- **Eritropoiese** → Corresponde à produção de eritrócitos, também conhecidos como glóbulos vermelhos, são responsáveis pelo transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos corporais e pelo transporte de dióxido de carbono (sob a forma de ião bicarbonato (HCO_3^-)) dos tecidos para os pulmões.
- **Linfopoiese** → Corresponde à produção de linfócitos (B e T) e células NK, estas células fazem parte do sistema imunológico adaptativo e inato, respetivamente, e estão envolvidas na resposta imunológica.
- **Granulopoiese** → Corresponde à produção de leucócitos granulares, tais como neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Estes desempenham um papel importante no sistema imunológico inato, contribuindo para a defesa do organismo contra infeções bacterianas, parasitas e alérgicas.
- **Monocitopoiese** → Corresponde à produção de monócitos que são libertados para a corrente sanguínea e migram até aos tecidos, uma vez nos tecidos diferenciam-se em macrófagos e desempenham funções importantes na resposta imunológica inata.
- **Trombopoiese** → Corresponde à produção de plaquetas, também conhecidas como trombócitos, estes desempenham um papel fundamental na coagulação sanguínea, aderem a lesões vasculares para formar o tampão plaquetário com vista a parar o sangramento, para além disso as plaquetas libertam fatores de coagulação e mediadores químicos que ajudam no início do processo de coagulação assim como na sua regulação.

A principal hormona que regula a hematopoiese é a eritropoietina (EPO). A EPO é produzida principalmente nos rins, mas também pode ser produzida no fígado, esta estimula a produção de células precursoras dos eritrócitos na medula óssea. Existem situações que promovem a produção de EPO, tais como: Hemorragia; hemólise; baixa saturação de oxigénio; e falência na síntese de hemoglobina [82,101]. Além da EPO existem outros fatores e citocinas (Figura 26) que desempenham papéis reguladores na hematopoiese, tais como: fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF); fator estimulador de

colónias de macrófagos (M-CSF), interleucina-3 (IL-3); e a trombopoietina (TPO) como podemos ver n.

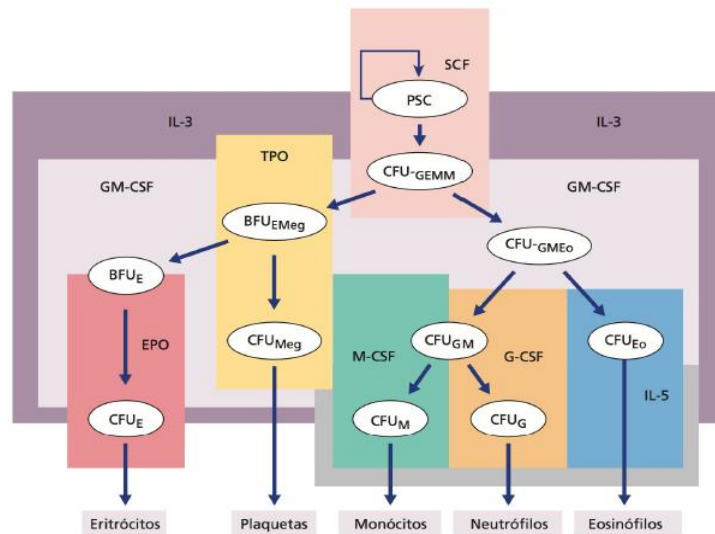


Figura 26: Regulação da Hematopoiese [101].

5.2. Hemograma

O hemograma é o exame ao sangue mais frequente de ser realizado num laboratório de hematologia. Este fornece informações detalhadas sobre os componentes do sangue, tais como: eritrócitos (eritrograma); leucócitos (Leucograma); e plaquetas (plaquetograma) [82] [134]. O laboratório de hematologia utiliza o analisador hematológico automatizado *Yumizen H2500, Horiba Medical* (Figura 27A) [135].

Este equipamento utiliza diferentes metodologias [136,137]:

- **Impedância Elétrica** – Esta técnica é utilizada na contagem e classificação dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, tendo por base a mudança na impedância elétrica, que ocorre quando as células passam por um campo elétrico. Cada tipo de célula sanguínea possui uma característica de impedância única, que permite a sua identificação e contagem.

- **Citometria de fluxo** – Esta técnica é utilizada na análise dos leucócitos e dos seus subtipos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos), esta utiliza um feixe de laser, que incide sob cada uma das células que constituem a população de

leucócitos, permitindo avaliar as características físicas e óticas e separá-las consoante o seu subtipo.

- **Colorimetria** – Esta técnica é utilizada para medir a concentração de hemoglobina (Hb) nos eritrócitos, são utilizados diferentes reagentes que promovem a lise dos eritrócitos e que reagem com a Hb para produzir uma mudança de cor. A intensidade da cor é proporcional à concentração da hemoglobina presente nas células.

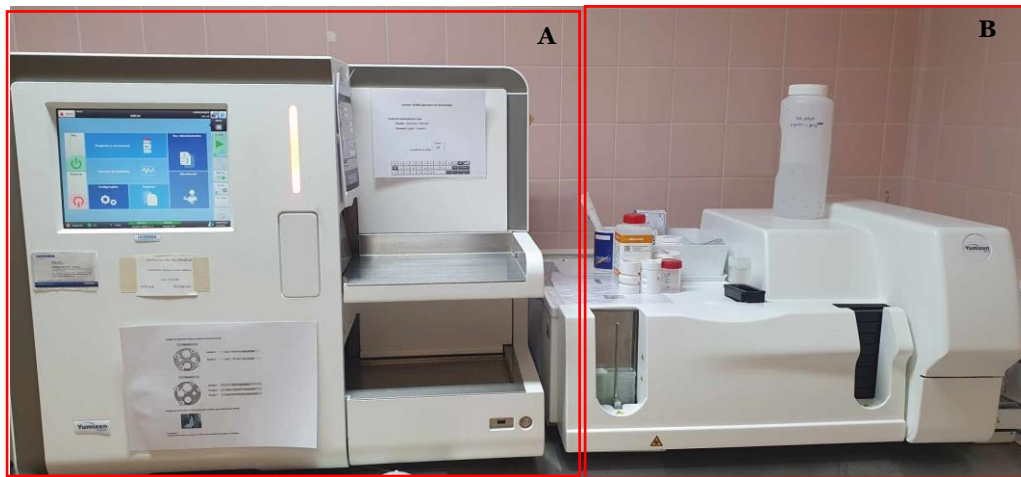


Figura 27: (A) – Yumizen H2500 (Horiba Medical) [135]; (B) – Yumizen SPS (Horiba Medical) [117] utilizados no laboratório de hematologia.

5.2.1. Eritrograma

O eritrograma é a parte do hemograma que avalia a linhagem vermelha (eritrócitos) do sangue periférico, também conhecidos como hemácias ou glóbulos vermelhos. Estas células apresentam um tempo médio de vida de 120 dias, após esse período elas são eliminadas no baço pelo sistema reticuloendotelial. Anomalias neste tipo de células estão normalmente associadas a quantidades insuficientes de eritrócitos ou pela redução na Hb, isto pode resultar numa condição conhecida como anemia. Estas células, em condições normais, são classificadas como normocíticas, o que significa que têm um tamanho dentro da normalidade, e normocrômicas, o que significa que têm uma quantidade e concentração de Hb dentro da normalidade. Esta nomenclatura é útil aquando da caracterização do tipo de anemia [101,134].

O eritrograma é constituído pelos seguintes parâmetros: contagem de eritrócitos, quantificação da Hb, análise do hemacrótico (Hct), cálculo dos índices hematimétricos (Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM),

Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), *Red Cell Distribution Width* (RDW) e pelos reticulócitos.

5.2.1.1. Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos são parâmetros calculados através de fórmulas específicas a partir da contagem dos eritrócitos, da concentração da Hb e do Hct [82].

- **Volume Corpuscular Médio**

Este parâmetro representa o tamanho médio dos eritrócitos e é expresso em fentolitros (fL), está relacionado com as alterações associadas ao tamanho dos eritrócitos. As anemias podem classificar-se tendo em conta o valor de VCM. Caso o VCM se encontre dentro dos valores de referência (80-95 fL) a anemia é classificada como normocítica. Caso o VCM seja superior ao valor de referência (>95 fL) a anemia é classificada como macrocítica. Caso o valor de VCM seja inferior ao valor de referência (<80 fL) a anemia é classificada como microcítica [101].

Este parâmetro é calculado de forma automática pelo aparelho através da seguinte fórmula [82]:

$$VCM (fL) = \frac{Hct (\%)}{Eritr\acute{o}citos \times \left(\frac{10^6}{\mu L}\right)} \times 10$$

- **Hemoglobina Corpuscular Média**

Este parâmetro representa a concentração média de Hb nos eritrócitos, ou seja, fornece informações acerca da quantidade de Hb presente em cada eritrócito [101]. É expresso em picogramas (pg) por célula e é calculado de forma automática pelo aparelho através da seguinte fórmula [82]:

$$HCM (pg) = \frac{Hb (g/dL)}{Eritr\acute{o}citos \times \left(\frac{10^6}{\mu L}\right)} \times 10$$

- **Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média**

Este parâmetro representa a concentração média de Hb presente num dado volume de eritrócitos e é expresso em g/dL. Caso o valor do CHCM se encontre dentro dos valores de referência (32-35 g/dL) a anemia é classificada como normocrômica. Caso o valor de CHCM seja inferior ao valor de referência (<32 g/dL) a anemia é classificada como hipocrômica [101].

Este parâmetro é calculado de forma automática pelo aparelho através da seguinte fórmula [82]:

$$CHCM (g/dL) = \frac{Hb (g/dL)}{Hematócrito (\%)} \times 100 \quad OU \quad CHCM (g/dL) = \frac{HCM}{VCM}$$

5.2.1.2. *Red Cell Distribution Width*

O RDW, em português Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos, é um parâmetro simples que reflete o grau de heterogeneidade do volume eritrócitário, mais convencionalmente conhecido como anisocitose [82,101].

O valor de RDW é expresso em percentagem (%) e varia, normalmente entre 12 e 17 %, um valor de RDW elevado reflete uma desregulação no tamanho dos eritrócitos, um valor de RDW baixo reflete uma uniformidade no tamanho dos eritrócitos, e isso geralmente é considerado normal, mas os valores de RDW devem sempre ser interpretados em conjunto com os outros parâmetros hematimétricos [82].

Este parâmetro é calculado de forma automática pelo aparelho através da seguinte fórmula [82]:

$$RDW (\%) = \frac{(VCM_{max} - VCM)}{VCM} \times 100 \%$$

5.2.1.3. Reticulócitos

Os reticulócitos são glóbulos vermelhos ainda imaturos, são libertados pela medula óssea para a corrente sanguínea e diferenciam-se em glóbulos vermelhos maduros. Os reticulócitos ainda contêm RNA ribossômico e não são capazes de transportar o

oxigênio. A liberação de reticulócitos na corrente sanguínea é um indicador da eficácia da eritropoiese, porém não nos dá informação acerca da qualidade da mesma. A partir da contagem dos reticulócitos nos pacientes com anemia é nos possível fazer a distinção entre anemias hipoproliferativas, onde há uma diminuição da produção e liberação de reticulócitos para a corrente sanguínea, e anemias hiperproliferativas onde ocorre o inverso [82].

5.2.2. Leucograma

O leucograma é a parte do hemograma que avalia a linhagem branca (leucócitos) do sangue periférico, também conhecidos como glóbulos brancos. Estas células apresentam-se como células esféricas, que podem ser classificadas como polimorfonucleares (possuem o núcleo polilobulado) e mononucleares (possuem o núcleo redondo). Dentro dos leucócitos polimorfonucleares temos os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, por sua vez, os leucócitos mononucleares são os monócitos e os linfócitos [82,101,137].

Os leucócitos estão envolvidos na defesa do corpo humano contra agentes patogênicos, infecções, substâncias estranhas e alergias. Cada um dos subtipos de leucócitos têm uma função [82,101,137]:

- **Neutrófilos** – São a população de leucócitos mais abundante na circulação e desempenham um papel importante na resposta imunológica inicial devido à sua rápida mobilização e capacidade de fagocitar e destruir os patógenos invasores.
- **Linfócitos (B e T)** – Os linfócitos T são responsáveis pela destruição das células infetadas por vírus e células tumorais (linfócitos T citotóxicos), por regular a resposta imunológica (linfócitos T reguladores) e pelo auxílio na ativação de outras células imunológicas (linfócitos T auxiliares), como é o caso dos linfócitos B, que são responsáveis pela produção de anticorpos específicos (imunoglobulinas) cuja função é reconhecer antígenos marcando-os para a destruição por outras células do sistema imunológico. Os linfócitos T e B fazem parte do sistema imunológico adaptativo.
- **Monócitos** – Os monócitos são células fagolíticas que ajudam na remoção de detritos celulares, bactérias e outros patógenos. Para além desta função, os monócitos também são capazes de processar e apresentar antígenos aos

linfócitos T, desencadeando respostas imunológicas específicas contra aquele antígeno, são também capazes de produzir citocinas, que desempenham papéis importantes na regulação imunológica, na inflamação e na comunicação entre diferentes células do sistema imunológico, e são capazes de migrar para os diferentes tecidos, onde consoante o local e as necessidades do sistema imunológico, diferenciam-se em macrófagos ou células dendríticas.

- **Eosinófilos** – Desempenham um papel importante na resposta imunológica contra parasitas, são recrutados para os locais de infecção onde libertam substâncias tóxicas ajudando a limitar a infecção e destruindo os parasitas. Os eosinófilos encontram-se também envolvidos na resposta imunológica a alérgenos, pois estes são ativados durante as reações alérgicas onde libertam mediadores inflamatórios que contribuem para os sintomas alérgicos.
- **Basófilos** – Esta população de leucócitos é a menos frequente e estão envolvidos na libertação de histamina, citocinas e leucotrienos, que promovem o processo inflamatório contribuindo para a resposta imunológica.

O leucograma é constituído pela contagem total e diferencial dos leucócitos. O resultado é expresso sob a fórmula leucocitária, onde é possível analisar os valores relativos e absolutos de cada subtipo leucocitário. Também é gerado um gráfico (LMNE) onde é possível analisar a dispersão de cada subtipo leucocitário (Figura 28), o eixo YY diz respeito à densidade ótica, enquanto o eixo XX diz respeito ao volume. Neste gráfico não é fornecida informação acerca dos basófilos [137].

A partir da fórmula leucocitária é possível identificar leucocitose onde há um aumento do número de leucócitos, esse aumento pode ser indicativo de uma resposta do sistema imunológico contra uma infecção ou pode ser causado por doenças inflamatórias, caso haja a diminuição do número de leucócitos, estamos perante uma leucopenia, que pode ser causada por infeções virais (HIV ou hepatite), por distúrbios da medula óssea ou por deficiências nutricionais, nestas situações, visto o organismo se encontrar deprimido de leucócitos, há o aumento do risco de infeções devido à incapacidade de uma resposta do sistema imunológica eficaz [101].

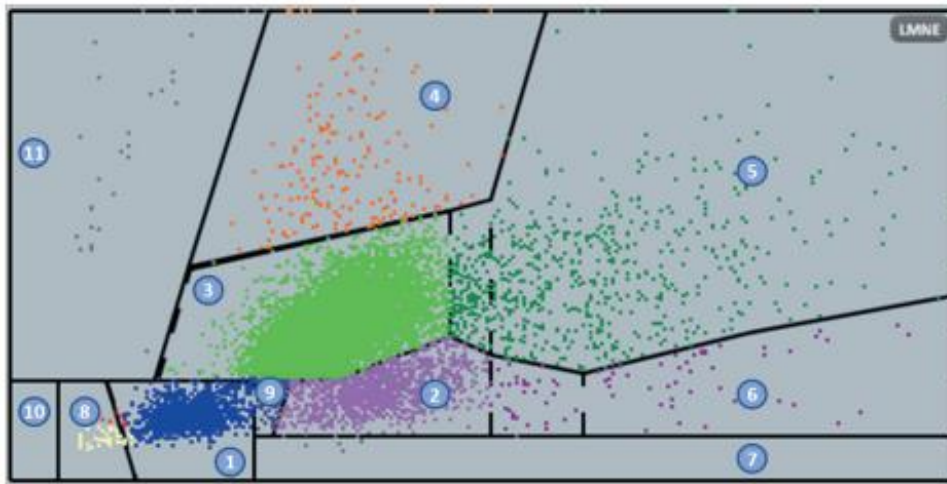


Figura 28: Matriz LMNE fornecida pelo *Yumizen H2500*. (1) – Linfócitos; (2) - Monócitos; (3) – Neutrófilos; (4) – Eosinófilos; (5) – Granulócitos Imaturos; (6) – Monócitos Imaturos; (7) – Linfócitos Imaturos; (8) – Eritroblastos ou Agregados Plaquetários; (9) – Linfócitos atípicos; (10) – Barulho de fundo baixo; (11) – Barulho de fundo alto [137].

5.2.3. Plaquetograma

O plaquetograma é a parte do hemograma que avalia as plaquetas presentes no sangue periférico. As plaquetas também são conhecidas como trombócitos e são pequenos fragmentos celulares anucleados produzidos na medula óssea a partir dos megacariócitos, estes sofrem um processo de maturação de 5 dias originando no final plaquetas, que são libertadas para a corrente sanguínea permanecendo em circulação por 7 a 10 dias e desempenham um papel importante nos processos de coagulação sanguínea e na manutenção da integridade vascular [82,101,138].

O plaquetograma é efetuado com recurso a amostras de sangue em tubos com EDTA, pois nestas condições as plaquetas permanecem separadas umas das outras, coisa que não acontece no sangue nativo, onde as plaquetas têm uma tendência para se agregarem umas às outras. Através deste exame é nos fornecido a contagem do número de plaquetas bem como a avaliação da sua morfologia para a determinação do volume plaquetar médio (MPV) e da variação entre volumes (PDW) [138].

O MPV dá-nos informação acerca da variação no tamanho das plaquetas. Um MPV elevado pode indicar o aumento na produção de plaquetas pela medula óssea, enquanto um MPV baixo pode indicar uma diminuição na produção. O PDW dá-nos informação acerca da amplitude de distribuição das plaquetas e é expresso em percentagem, um

PDW alto sugere uma grande variação no tamanho das plaquetas, enquanto um PDW baixo indica uma distribuição mais uniforme [138].

O valor normal para a contagem das plaquetas varia entre 150000 e 450000 plaquetas/ μ L de sangue. Uma contagem de plaquetas acima do intervalo normal (>450000 plaquetas/ μ L de sangue) indica-nos a presença de trombocitose, que pode ser causada por várias condições médicas e em casos extremos pode aumentar o risco de formação de coágulos e, conseqüentemente, levar ao aumento do risco de trombose. Caso a contagem de plaquetas seja inferior ao intervalo normal (<150000 plaquetas/ μ L de sangue) indica-nos a presença de trombocitopenia, que pode ser causada por várias condições médicas e pode aumentar o risco de sangramento, pois devido à diminuição do número de plaquetas o processo de coagulação encontra-se comprometido [101,137].

5.3. Análise Microscópica

A análise microscópica envolve a observação de esfregaços de sangue ao microscópio com o objetivo de visualizar a morfologia, quantidade e qualidade das células sanguíneas, de modo a identificar possíveis anormalidades [82].

Para a visualização das células sanguíneas ao microscópio é necessário a realização de um esfregaço de sangue onde o primeiro passo consiste na colocação de uma pequena gota de sangue numa lâmina. No segundo passo, com auxílio de outra lâmina num ângulo de 45° , a gota é espalhada ao longo da superfície da lâmina de modo a formar uma camada fina de células [82]. Posteriormente, o esfregaço de sangue é fixado, com recurso a metanol e corado pela técnica de *May-Grunwald-Giemsa* ou pela coloração de *Perls*.

O equipamento *Yumizen SPS, Horiba Medical* (Figura 27B) realiza os esfregaços e as diferentes colorações de forma automatizada. O equipamento *CellaVision® DC-1* (Figura 29) visualiza o esfregaço de sangue corado e realizar a contagem das células, fornecendo no final as imagens das diferentes células sanguíneas que foram contabilizadas [116,117].

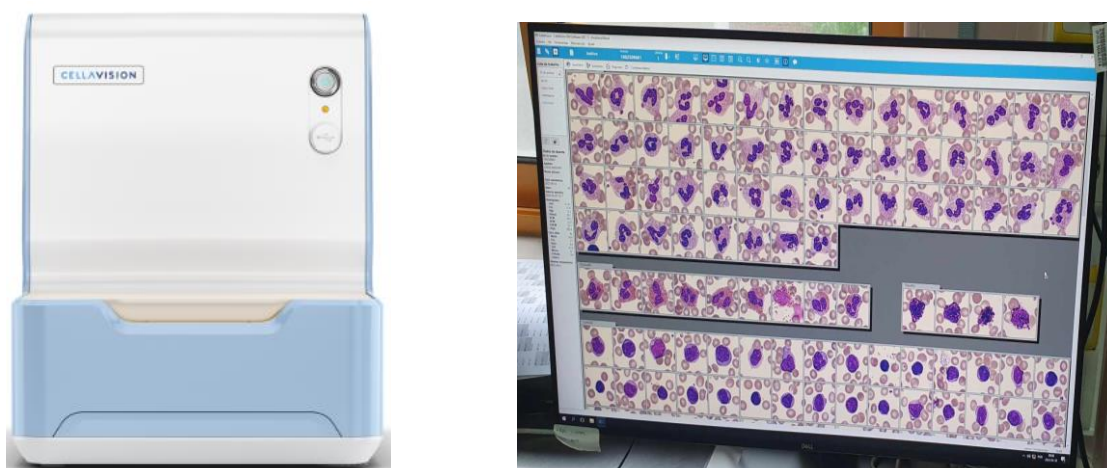


Figura 29: *CellaVision*[®] DC-1 utilizado no laboratório de hematologia e software de visualização de imagens acoplado [116].

5.3.1. Técnicas de Coloração

5.3.1.1. Coloração de *May-Grunwald-Giemsa*

A coloração de *May-Grunwald-Giemsa* destina-se à coloração de esfregaços de sangue periférico, e permite a visualização detalhada de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, plaquetas e de outras estruturas presentes no sangue. Este tipo de coloração baseia-se na aplicação, de modo sucessivo, de dois corantes diferentes: o corante de *May-Grunwald*, que é composto por uma mistura de azul de metileno e eosina que formam o composto eosinato de azul metileno, este composto cora os núcleos de tons azul-roxo e o citoplasma em tons vermelho-rosa; o corante de *Giemsa* é uma mistura complexa de vários corantes (eosina, azul metileno e azul de azur II) que aumenta a intensidade da coloração de modo a melhor evidenciar os diferentes elementos celulares [82,113,114].

5.3.1.2. Coloração de *Perls*

A coloração de *Perls*, também conhecida como coloração de ferro, destina-se a identificar a presença de ferro em amostras de medula óssea, porém, também pode ser usada para corar esfregaços de sangue periférico para identificar a presença de sideroblastos e siderócitos. A coloração de *Perls* baseia-se na reação entre o ferrocianeto de potássio com o íon férrico (Fe^{3+}) presente no grupo heme, que forma um composto insolúvel, que após o uso do reagente azul de Prússia fica corado de azul permitindo assim identificar os depósitos de ferro [82,112,115].

5.3.2. Teste de Falciformação

O teste da falciformação é utilizado para confirmar a presença de HbS no sangue, Hb responsável pela anemia falciforme. Este tipo de anemia é uma doença genética hereditária recessiva caracterizada pela presença de eritrócitos em forma de foice/meia-lua. A mutação no gene da hemoglobina afeta a sua estrutura fazendo com que em determinadas condições fisiológicas, neste caso, quando o oxigênio é removido, a HbS polimerize formando cristais rígidos que deformam o eritrócito, adquirindo a forma de foice/meia-lua [82,101,118].

No laboratório de hematologia o teste de falciformação divide-se em três passos: O primeiro passo consiste na adição de metabissulfito de sódio a 2% à amostra de sangue periférico numa lâmina, a adição deste composto permite criar um ambiente de baixo teor de oxigênio, que é a condição necessária para a formação dos eritrócitos em forma de foice/meia-lua, após ser adicionado o metabissulfito de sódio a 2% é colocado uma lamela sob a lâmina e esta é vedada com parafina, de modo a impedir a entrada de oxigênio; o segundo passo consiste na incubação da lâmina vedada a 37° C durante 1 hora, de modo a mimetizar as condições fisiológicas; o terceiro passo consiste na observação da lâmina ao microscópio (Figura 30) [82,101,118].

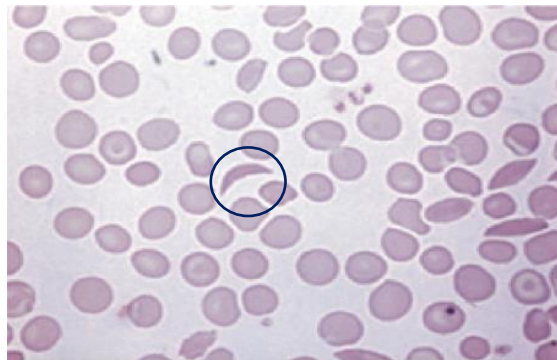


Figura 30: Eritrócito Falciforme [101]

5.4. Hemoglobina Glicada, A2 e Fetal

A hemoglobina glicada (HbA1C), a hemoglobina A2 (HbA2) e a hemoglobina fetal (HbF) são três formas diferentes da hemoglobina encontradas no sangue humano, sendo que cada uma apresenta características e funções específicas:

- **HbA1C:** É uma forma modificada de hemoglobina onde a molécula de glicose se encontra ligada de forma irreversível. Através da análise da concentração da HbA1C podemos avaliar o estado glicémico do organismo nos últimos 2 a 3

meses, uma vez que os eritrócitos têm um tempo de vida de 120 dias, e ao longo desse tempo incorpora a glicose existente na circulação. Por esta razão a avaliação da HbA1c é usada principalmente no diagnóstico e controlo de pacientes com diabetes *mellitus* [82,109].

- **HbA2:** É uma das formas normais de hemoglobina encontrada no sangue, é composta por duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$), e a sua concentração no sangue é pequena quando comparada com a hemoglobina A1. A quantificação da HbA2 é bastante útil no diagnóstico de distúrbios das hemoglobinas, como por exemplo beta-talassemias, uma vez que neste tipo de doenças há uma diminuição na produção de HbA1, e por consequência há um aumento na produção de outras formas de hemoglobina, como é o caso da HbA2 [82,110].
- **HbF:** É a forma predominante de hemoglobina encontrada nos fetos em desenvolvimento, esta é composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$). Após o nascimento a produção de HbF diminui gradualmente sendo então substituída pela HbA1, o facto de os níveis de HbF se encontrarem altos após o nascimento pode ser indicativo de certas condições médicas, como por exemplo anemia falciforme (HbS) [82,110].

O equipamento automatizado *ADAMS™ A1c HA-8180T*, *ARKRAY* (Figura 31) efetua a análise destes parâmetros através de amostras de sangue em tubos com EDTA. Este equipamento utiliza como metodologia a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em que a medição se baseia numa troca aniónica de fase reversa. O processamento da amostra pode ser dividido em três fases: a primeira fase consiste na lise dos glóbulos vermelhos para libertar a hemoglobina do seu interior, seguido da adsorção da hemoglobina (carga negativa) ao longo da matriz (carga positiva) devido às interações entre as diferentes cargas; a segunda fase consiste na eluição faseada das diferentes frações de hemoglobina com recurso tampões com diferentes forças iónicas; a terceira fase consiste na deteção das diferentes frações de hemoglobina através da medição da sua absorvância num comprimento de onda específico, a quantidade de cada fração de hemoglobina presente na amostra é determinada comparando a área do pico cromatográfico de cada um dos tipos de hemoglobinas com padrões de referência para concentrações conhecidas [82,109,111].

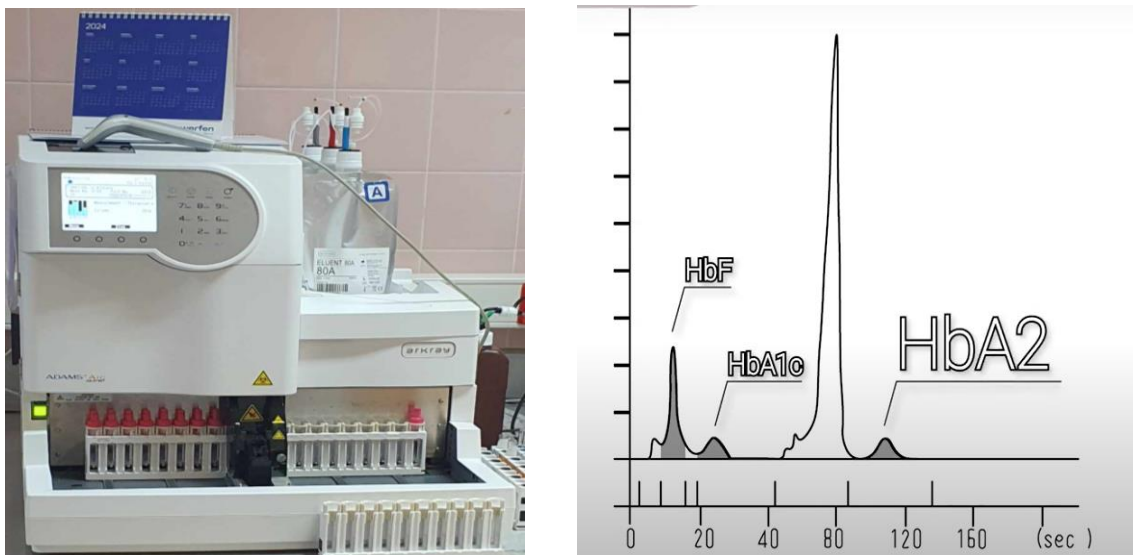


Figura 31: ADAMS™ A1c HA-8180T (ARKRAY) utilizado no laboratório de hematologia e gráfico com os picos de absorvância de cada tipo de hemoglobina vs tempo (s) [108].

5.5. Velocidade de Sedimentação

A VS consiste na capacidade de os eritrócitos sedimentarem quando o sangue venoso bem homogeneizado (colhido para um tubo de citrato de sódio numa proporção 1:4) é colocado na vertical, sendo que ao fim de 1 hora sob a influência da gravidade, é medida a distância em milímetros (mm) entre a superfície líquida do plasma e a superfície de sedimentação dos eritrócitos [82].

O equipamento *Sediplus® S 2000*, DESAGA (Figura 32) é capaz de efetuar a medição da VS, este encontra-se programado para fazer 3 leituras através da transmissão da luz infravermelha e segue o método de Westergren: a primeira leitura é efetuada assim que o tubo é inserido no aparelho, e serve para fazer o zero; a segunda leitura é efetuada ao fim de 30 minutos, e serve apenas para fins comparativos aquando da visualização do resultado da VS ao fim de 1 hora, sendo que quando comparados os valores da VS ao fim de 30 minutos e ao fim de 1 hora o esperado é que o valor aumente ou se mantenha muito parecido, o que não é espectável é que o valor se mantenha exatamente igual ou que diminuía, nesses casos é necessário repetir a VS, pois algum erro causou essas diferenças anormais; a terceira leitura é efetuada ao fim de 1 hora e o resultado é expresso em mm/h [107].

A VS é influenciada por várias condições médicas podendo aparecer aumentada na presença de uma inflamação, infeção, doença autoimune, cancro, entre outras condições, porém, é importante salientar que a VS é um teste não específico e que uma

taxa de sedimentação aumentada pode ser causada por uma variedade de condições, e uma taxa normal não exclui a presença de uma condição médica subjacente, por esta razão a VS é utilizada no monitoramento e como parte inicial da avaliação de pacientes com sintomas inespecíficos, sendo combinada com outros testes e exames clínicos, de modo a obter um diagnóstico clínico mais preciso e completo [82].



Figura 32: *Sediplus® S 2000* utilizado no laboratório de hematologia [107].

5.6. Hemóstase

A hemóstase pode ser definida como o processo fisiológico através do qual o corpo humano controla a perda de sangue em caso de lesão vascular e ao mesmo tempo controla o risco de trombose. O corpo humano tem ao seu dispor um equilíbrio entre ativadores e inibidores da coagulação, que após lesão num vaso sanguíneo, entram em ação com o objetivo de controlar a hemorragia de forma rápida e controlada. O processo de hemóstase envolve um grande número de fatores, incluindo: plaquetas, granulócitos, monócitos, fatores de coagulação (contribuem para a formação do coágulo), fatores do sistema fibrinolítico (contribuem para a lise do coágulo) e proteínas anticoagulantes (reguladoras do processo de coagulação). Uma vez que existem diversos intervenientes no processo de hemóstase, podemos dividi-la em quatro fases: a 1^o fase corresponde à vasoconstrição; a 2^o fase corresponde à hemóstase primária (formação do tampão plaquetar); a 3^o fase corresponde à cascata da coagulação; e a 4^o fase corresponde à fibrinólise (dissolução do coágulo) [82,101].

5.6.1. Vasoconstrição

Quando ocorre uma lesão nos vasos sanguíneos é gerada, de forma imediata, a vasoconstrição, as células musculares lisas presentes na parede dos vasos sanguíneos

contraem com o intuito de diminuir o fluxo sanguíneo para aquele local, de modo a reduzir as perdas de sangue. A vasoconstrição é regulada e desencadeada por uma combinação de sinais elétricos e substâncias químicas libertadas localmente [101].

5.6.2. Hemóstase Primária

A hemóstase primária baseia-se na atividade das plaquetas e na sua capacidade para formar o trombo plaquetário. As plaquetas são as primeiras células a alcançar a lesão vascular e, por essa razão, são responsáveis por iniciar o processo hemostático através da criação de um tampão plaquetário com o objetivo de impedir a perda de sangue. A formação do trombo plaquetário ocorre devido à exposição do colagénio, que serve como mediador do fator de *Von Willebrand* (FVW), que facilita a adesão e a agregação plaquetária ao local da lesão [82,101].

Após a formação do tampão plaquetar ocorre a ativação dos fatores de coagulação que iniciam a hemóstase secundária, que culmina na formação de um coágulo de fibrina estável, que sela o local da lesão [82,101].

5.6.3. Coagulação

A hemóstase secundária corresponde ao processo de coagulação sanguínea onde no final há a formação de um coágulo de fibrina estável. O processo de formação do coágulo está inserido num processo fisiológico denominado cascata da coagulação, onde por uma sequência de proteólises há a formação de trombina, que, por sua vez, converte o fibrinogénio solúvel do plasma em fibrina. A fibrina infiltra-se nos agregados plaquetares, formando os coágulos de fibrina que são mais estáveis, firmes e definitivos [101].

A cascata da coagulação encontra-se dividida em três vias: Via intrínseca; via extrínseca; e via comum. A via intrínseca é ativada após a interação entre o sangue e o colagénio, exposto pela lesão vascular, isto leva à conversão do fator XII na sua forma ativa (XIIa), este por sua vez ativa o fator XI, sendo esta conversão mediada pelo cininogénio de alto peso molecular (HMWK) e pela pré-caliceína (PK), o fator XI ativado (XIa) converte o fator IX na sua forma ativa (IXa) que em conjunto com o fator VIII (transportado pelo FVW) ativam o fator X (Xa). A via extrínseca é ativada pela exposição do sangue ao fator tecidual (TF), que é libertado pelas células endoteliais danificadas do vaso sanguíneo, este TF é uma proteína pró-coagulante e converte o fator VII circulante na sua forma ativa (VIIa), o fator VIIa forma um complexo enzimático com o TF, que converte o fator X na sua forma ativa (Xa). A via intrínseca e

a via extrínseca convergem numa via comum, em ambas ocorre a ativação do fator Xa, este associa-se ao fator Va e forma o complexo protrombinase, este complexo converte a protrombina em trombina, que é a sua forma ativa. A trombina é então responsável pela conversão do fibrinogénio solúvel em monómeros de fibrina, que promove a formação de um coágulo estável [82,101]. Na Tabela 16 encontram-se presente alguns dos fatores que participam na cascata da coagulação [82].

Tabela 16: Número e respetivo nome dos fatores da coagulação.

Número do fator	Nome
I	Fibrinogénio
II	Protrombina
III	Fator Tecidual
V	Fator Lábil
VII	Proconvertina
VIII	Fator anti-hemofílico
IX	Fator Christmas
X	Fator Stuart-Prower
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática
XII	Fator Hageman
XIII	Fator estabilizador da fibrina

5.6.4. Fibrinólise

A fibrinólise corresponde à última fase do processo hemostático e ocorre quando a hemóstase foi alcançada e a lesão reparada. O sistema fibrinolítico endógeno é ativado para eliminar a fibrina formada na fase anterior, com o objetivo de manter a permeabilidade da circulação de forma a evitar um evento trombótico. Durante a fibrinólise o plasminogénio dá origem à enzima plasmina, que é ativada para degradar a fibrina, esta enzima age sobre a fibrina clivando-a em fragmentos solúveis chamados produtos de degradação da fibrina (PDFs), que são removidos da circulação pelo sistema reticuloendotelial. A regulação da fibrinólise ocorre por meio de inibidores do ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) e da antiplasmina que são responsáveis por inibir a ação da plasmina [82,101].

5.6.5. Estudo da Hemóstase

No laboratório de hematologia os estudos relacionados com o processo de coagulação são efetuados no equipamento automatizado *ACL TOP 750 CTS, Werfen* (Figura 33) a partir de plasma colhido em tubos de citrato de sódio, que foi previamente centrifugado (3500 rpm durante 15 minutos) [21,119].



Figura 33: ACL TOP 750 CTS (Werfen) utilizado no laboratório de hematologia [119].

Este equipamento é capaz de realizar medições coagulométricas (turbidimétricas), cromogéneas (absorvância) e imunológica [119,120]:

- **Deteção coagulométrica (turbidimetria)** - É usada para avaliar e registar o tempo que é necessário para uma amostra de plasma coagular. Esta técnica de medição utiliza um fotómetro que é usado para mediar a turbidez da amostra, a turbidez da aumenta à medida que o coágulo se forma. O equipamento encontra-se programado para efetuar uma leitura da turbidez ao fim de um determinado período de tempo, e consoante a leitura da turbidez indica-nos se o tempo de coagulação é normal, prolongado (coagulação ocorre de forma mais lenta) ou diminuído (coagulação ocorre de forma mais rápida que o normal).
- **Deteção cromogénea (absorvância)** – É usada para avaliar a atividade das enzimas e proteínas anticoagulantes envolvidas no processo de coagulação. Esta técnica usa *para*-nitroanilina (pNA) como substrato para as enzimas e proteínas anticoagulantes envolvidas na cascata da coagulação, estas convertem este substrato num composto colorido, que pode ser quantificado através da leitura da absorvância a 405 nm, a luz é absorvida pelo fluido e a quantidade de luz que chega ao fotodetector é convertida num sinal elétrico, que é proporcional à atividade da enzima ou proteína anticoagulante. Os testes de deteção cromogénea podem ser divididos em testes cromogéneos diretos e indiretos. Nos testes cromogéneos diretos o analito de interesse age diretamente com o substrato para formar um produto cromogénico, que posteriormente é quantificado. Nos testes cromogéneos indiretos o analito de interesse é quantificado através da sua capacidade de catalisar uma reação que gera um

produto cromogénico, sendo a quantidade do analito de interesse inversamente proporcional ao produto cromogénico gerado.

- **Deteção imunológica** – É usado para medir e registar diretamente a quantidade de um analito através da mudança da densidade ótica. Este método de deteção é bastante semelhante ao método coagulométrico, porém, o método de deteção imunológico baseia-se na formação de complexos antigénio-anticorpo, a formação destes complexos vai afetar a transmissão da luz e a quantidade dos complexos antigénio-anticorpo é inversamente proporcional à transmissão da luz, ou seja, quantos mais complexos se formarem menor vai ser a transmissão da luz, logo maior é a densidade ótica.

Podemos dividir o estudo da coagulação em: coagulação normal (testes de rotina) e coagulação especial. No estudo da coagulação normal são avaliados parâmetros como: Tempo de Protrombina (TP); Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT); D-Dímeros e Fibrinogénio. Por sua vez, na coagulação especial podem ser avaliados parâmetros relacionados com o estudo da trombofilia (Antitrombina (AT), Proteína C, Proteína S livre, Mutações no Fator V Leiden e/ou Fator II (Protrombina), Anticoagulante lúpico (AL) e FVW), para além do doseamento de qualquer outro fator presente na cascata da coagulação, como por exemplo doseamento do Fator VIII e IX (estudo das hemofilias), caso seja pedido pelo médico clínico [21].

5.6.6. Testes de Rotina

Como referido anteriormente, os testes de rotina efetuados no laboratório de hematologia da ULS Cova da Beira são:

- **Tempo de Protrombina (TP)** – Está relacionado com a via extrínseca e comum da cascata da coagulação e avalia os fatores VII, X, V, II e fibrinogénio. Neste teste é avaliado o tempo (em segundos) necessário para a formação do coágulo após a adição da tromboplastina, que consiste numa mistura de fatores tecidulares (TFs), lípidos e cloreto de cálcio) ao plasma pobre em plaquetas. Caso o PT seja corrigido após a adição do plasma normal, encontramos na presença de uma deficiência, congénita ou adquirida, do(s) fator(es) da coagulação envolvidos na via extrínseca e/ou via comum. Caso o PT permaneça prolongado após a adição do plasma normal, significa que os inibidores da coagulação podem estar aumentados [82,101,121].

- **Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT)** – Está relacionado com a via intrínseca e comum da cascata da coagulação e avalia os fatores VIII, IX, XI e XII, para além dos fatores X, V e fibrinogénio. Neste teste é avaliado o tempo (em segundos) necessário para a formação do coágulo, inicialmente o plasma do doente é incubado com fosfolípidos durante alguns minutos, de seguida, é acrescentado cloreto de cálcio e é medido o tempo necessário para a formação do coágulo. Neste teste os fosfolípidos e os iões de cálcio funcionam como ativadores de contacto, dando assim início à cascata de coagulação pela via intrínseca, o tempo que o plasma demora a formar o coágulo corresponde ao aPTT. Caso o aPTT se encontre prolongado encontramos-nos na presença de uma deficiência, congénita ou adquirida, do(s) fator(es) da coagulação envolvidos na via intrínseca e/ou via comum. Caso o aPTT se encontre diminuído, que é menos comum que um aPTT prolongado, significa que estamos perante um estado de hipercoagulabilidade, no qual há uma maior preponderância à formação de coágulos, essa maior preponderância pode ser causada pelo excesso de fatores da coagulação ou por uma diminuição dos anticoagulantes naturais na circulação [82,101,122].
- **D-Dímeros** – Este teste serve para avaliar os fragmentos (D-Dímeros) que são produzidos quando a plasmina cliva a fibrina para degradar os coágulos no processo de fibrinólise. Anticorpos monoclonais podem ser direcionados para detetar estes fragmentos, e podem ser usados como marcadores para confirmar que a cascata da coagulação e a fibrinólise estão a decorrer de forma normal, ou seja, a deteção de D-Dímeros serve para confirmar que na cascata da coagulação a trombina é formada, e que na fibrinólise a fibrina é degradada. Indivíduos saudáveis têm baixos níveis destes marcadores na circulação, isto faz com que a quantificação destes fragmentos tem sido usada para prever quais são os utentes mais propensos a desenvolver tromboembolismo venoso (VTE) [82,101,123].
- **Fibrinogénio** – O fibrinogénio, ou fator I, é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado, que durante o processo de coagulação é convertido em fibrina por ação da trombina. O fibrinogénio é composto por três frações de polipeptídeos (alfa, beta e gama) que são mantidos juntos por pontes de dissulfeto, o fibrinogénio C corresponde à fração gama e é responsável por interagir com outras moléculas de fibrinogénio, e por esta razão ele desempenha um papel crucial aquando da formação do coágulo e da manutenção da sua estrutura. A quantificação do

fibrinogénio é feita através do método de *Clauss*, onde é adicionado ao plasma diluído um excesso de trombina e é medido o tempo de coagulação. O tempo de coagulação vai ser inversamente proporcional à concentração plasmática de fibrinogénio, ou seja, quanto mais fibrinogénio presente no plasma, menor vai ser o tempo de coagulação (a coagulação vai ser mais rápida). O fibrinogénio também é considerado como uma proteína de fase aguda associada a processos inflamatórios encontrando-se elevada nesses processos [82,101,124].

5.6.7. Estudo da Trombofilia

A trombofilia é uma condição médica onde há uma tendência aumentada para a formação de trombos (coágulos sanguíneos), esses trombos são capazes de se formar em qualquer parte do sistema circulatório, porém a sua formação é mais comum nas veias profundas das pernas, associada a trombose venosa profunda, sendo menos comum nos pulmões, associada a embolias pulmonares [126].

A trombofilia pode ser herdada ou adquirida. Entre as causas mais comuns associadas a trombofilia temos [126]:

- **Fatores Genéticos** - Mutações no Fator V *Leiden* (1691 G>A), mutação na Protrombina (20210 G>A), deficiência de Antitrombina, deficiência na proteína C e S.
- **Condições Médicas** - Cancro, obesidade, síndrome antifosfolípido (APS) e doenças autoimunes (Lúpus).
- **Estilo de Vida** - Tabagismo, sedentarismo, uso de contraceptivos orais, gravidez e período pós-parto.
- **Lesões ou Cirurgias** – Lesões traumáticas graves, cirurgias extensas e imobilização prolongada.

O painel de estudo para a trombofilia consiste em testar, em simultâneo, mutações associadas ao Fator V *Leiden* e Protrombina, deficiências na Antitrombina, Proteína C e S, pesquisa de Anticoagulante Lúpico e pesquisa de doença de Von Willebrand [21,126].

O estudo das mutações associadas ao Fator V *Leiden* e Protrombina encontram-se explicado na secção 5.8.

5.6.7.1. Antitrombina

A antitrombina (AT), também chamada antitrombina III, é uma glicoproteína produzida pelo fígado, que tem atividade anticoagulante. A antitrombina é um inibidor da serina protéase, pertence à família das serpinas, e é responsável por regular a atividade proteolítica das protéases pró-coagulantes presentes nas vias intrínsecas e extrínsecas. A AT atua diretamente na trombina e no fator X ativado (FXa), mas também atua nos fatores VIIA, IXa e XIa. Uma deficiência, adquirida ou congénita, de AT está associado ao aumento do risco de trombose venosa e/ou embolia pulmonar [82,126,127].

A quantificação da AT é efetuada com recurso ao método cromogéneo indireto, onde o plasma do doente é incubado com o reagente Fator Xa, na presença de excesso de heparina para amplificar a capacidade de a antitrombina exercer o seu papel anticoagulante. O FXa residual reage com um substrato cromogéneo sintético, que produz um produto cromogéneo, que é monitorizado a 405 nm, e a quantidade de AT presente na amostra é inversamente proporcional ao produto cromogéneo produzido [120,125].

5.6.7.2. Proteína C

A proteína C é uma pró-enzima dependente de vitamina K, que é convertida em proteína C ativada (APC) pelo complexo trombina e trombomodulina. Após a proteína C ser ativada, a APC forma um complexo com a proteína S para inativar o fator Va e degradar o fator VIIIa, através desta inativação a formação de trombina é cessada resultando num aumento da atividade fibrinolítica. Um défice dos níveis de proteína C está associado à hipercoagulação aumentado assim o risco de tromboembolismo venoso [82,101,128].

A quantificação da proteína C é efetuada com recurso ao método cromogéneo direto, onde a o plasma do doente é incubado com um ativador da proteína C (veneno de serpente), com a ativação da proteína C esta é convertida em APC, que é quantificada com recurso a um substrato cromogéneo sintético, o produto cromogéneo resultante é monitorizado a 405, e a quantidade de proteína C presente na amostra é diretamente proporcional ao produto cromogéneo produzido [120,125].

5.6.7.3. Proteína S

A proteína S funciona como cofator da APC, o complexo APC mais proteína S é responsável por inativar o fator Va e por degradar o fator VIIIa. A proteína S pode-se

encontrar no plasma de duas formas: ligada à proteína C através de uma proteína do complemento (C₄b) (60%), ou na sua forma livre (40%). A deficiência na PS pode ser adquirida ou congénita e está associada ao aumento do risco de tromboembolismo venoso [82,101,129].

A quantificação da proteína S livre é efetuada com recurso ao método imunológico, onde são adicionados anticorpos monoclonais à amostra de plasma do doente, que reconhecem a proteína S livre e formam complexos antigénio-anticorpo. A quantidade de complexos antigénio-anticorpo é inversamente proporcional à transmissão da luz, ou seja, a quantidade de proteína S livre na amostra é inversamente proporcional à transmissão da luz [120,125].

5.6.7.4. Anticoagulante Lúpico

O anticoagulante lúpico (AL) é um autoanticorpo que atua contra os fosfolípidos presentes na membrana das plaquetas, fatores de coagulação, protrombina, proteína S, superfície endotelial dos vasos sanguíneos, entre outros, esses autoanticorpos são denominados “lúpicos” porque foram originalmente identificados em doentes com lúpus. Estes autoanticorpos interferem na coagulação sanguínea prolongando os testes de coagulação (aPTT) [130,131].

Para a deteção de AL são utilizados dois métodos: o veneno de víbora de Russel diluído (dRVVT) e o teste Silica Clotting Time (SCT). Em ambos os testes são realizados um teste de rastreio (Screening) e um teste confirmatório. O teste de Screening SCT possui baixa concentração de fosfolípidos, esta característica faz com que o reagente seja altamente sensível à presença de AL no plasma, caso se encontre presente AL na amostra de plasma do doente o aPTT vai ser prolongado, por sua vez, o SCT confirmatório consiste numa alta concentração de fosfolípidos, que neutralizam o AL, portanto, caso se encontre presente AL na amostra de plasma do doente o aPTT vai ser encurtado. No teste dRVVT, o veneno funciona como ativador do FX e leva à formação do coágulo de fibrina, caso a amostra de plasma do doente contenha AL, este ao se ligar aos fosfolípidos vai impedir a ação do veneno, e conseqüentemente, prolonga o aPTT [130-132].

Caso ambos os testes (screening e confirmatório) tenham os tempos de coagulação aumentados significa que a amostra de plasma é positiva para o estudo de AL.

5.6.7.5. Fator de *Von Willebrand* (FVW)

O FVW é uma glicoproteína de alto peso molecular produzida pelas células endoteliais e pelos megacariócitos, que desempenha dois papéis fundamentais: promove a adesão das plaquetas e é a molécula transportadora e estabilizadora do fator VIII (protegendo-o de destruição prematura). Doentes com uma deficiência quantitativa ou qualitativa do FVW estão associados a concentrações diminuídas do fator VIII, e por esta razão estes pacientes são afetados pela doença de *Von Willebrand* (DVW) [101,133].

A quantificação do FVW é feita com recurso ao método imunológico onde o plasma do doente, com citrato de sódio, é misturado com um reagente de látex e tampão de reação. Se o plasma do doente for positivo para o antigénio (FVW), as partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais aglutinam-se ao antigénio. A quantidade de FVW na amostra é diretamente proporcional à quantidade de complexos anticorpo-antigénio formados e inversamente proporcional à transmissão da luz [120,125].

5.7. Testes Biologia Molecular

Os testes de biologia molecular realizados no SPC da ULS Cova da Beira são efetuados no equipamento *GeneXpert*[®], que é um equipamento automatizado fabricado pela *Cepheid*, e utiliza a técnica PCR, como referido no tópico 4.7 [76].

Os testes de biologia molecular utilizados pelo laboratório de hematologia são: Teste *Xpert*[®] HemosIL FII & FV e Teste *Xpert*[®] BCR-ABL Ultra.

5.7.1. Teste *Xpert*[®] HemosIL FII & FV

Este teste tem como objetivo a deteção de mutações associadas ao Fator II (Protrombina) e ao Fator V de *Leiden* em amostras de sangue. Nos últimos anos foi demonstrado que o tromboembolismo venoso é uma patologia complexa que depende da interação entre fatores adquiridos e fatores genéticos, portanto, mutações associadas ao Fator II e ao Fator V de *Leiden* têm um papel importante na patogénese da trombose venosa profunda em conjunto com fatores adquiridos e idade [102].

A mutação associada ao Fator II (G20210A) deriva de uma substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 20210, esta mutação não resulta diretamente na substituição de um aminoácido na proteína, uma vez que esta mutação está localizada na região não codificante do gene, porém esta mutação cria um sítio de poliadenilação mais eficiente permitindo que o RNA mensageiro (mRNA) seja mais

estável levando a um aumento da produção de protrombina, promovendo assim a formação de coágulos [102,104].

A mutação associada ao Fator V (G1691A) deriva de uma substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 1691, esta mutação leva à substituição do aminoácido glutamina por arginina tornando o fator V resistente à clivagem pela APC (anticoagulante natural), esta resistente contribui para a continua atividade do fator V na cascata de coagulação promovendo a formação de coágulos [102,105].

O kit Xpert® HemosIL FII & FV é pronto a usar e permite detetar a presença destas mutações indicando, para cada uma, se esta é heterozigótica, homozigótica ou normal (inexistência da mutação) [102].

5.7.2. Teste Xpert® BCR-ABL Ultra

Este teste tem como objetivo detetar transcritos de mRNA do gene BCR-ABL1 em amostras de sangue periférico de doentes diagnosticados com Leucemia Mielóide Crónica (LMC) [103].

O gene BCR-ABL resulta de uma translocação entres os braços longos dos cromossomas 9 e 22, o que provoca a fusão entre o gene ABL1 (presente no cromossoma 9) e o gene BCR (presente no cromossoma 22) formando o cromossoma Filadélfia. Este gene híbrido produz uma proteína quimérica com atividade tirosina quinase aumentada levando ao aparecimento de leucemias. O cromossoma Filadélfia encontra-se presente em mais de 90% dos doentes com LMC, sendo que a sua deteção é importante para o diagnóstico e monitorização da doença, assim como da terapêutica à base de inibidores da tirosina quinase [103,106].

O kit Xpert® BCR-ABL Ultra requer que a amostra de sangue periférico seja tratada previamente com detergentes que provoquem a lise dos eritrócitos e só depois é que este é adicionado ao cartucho do kit, após ser realizado o teste de PCR este indica a quantidade de transcritos de mRNA do gene BCR-ABL que estão presentes na amostra, podendo então, para os casos onde os pacientes já se encontram sob terapêutica, analisar se esta está a ser viável ou não [103].

5.8. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é executada no laboratório de hematologia com recurso ao citometro *BD FACSCalibur*TM (Figura 34), que permite a análise de vários parâmetros a

partir de uma suspensão celular, o facto de a amostra ter de ser uma suspensão é critério para esta técnica, pois caso a amostra não seja uma suspensão está criado o entrave à realização da mesma [82,139,142]. O citómetro *BD FACSCalibur™* permite a utilização de vários anticorpos marcados diretamente com fluorocromos, que são usados com vista a diagnosticar e a monitorizar doenças hematológicas, como é o caso de linfomas, leucemias e outras condições (por exemplo monitoramento pacientes com HIV). O laboratório possui painéis de estudo com os antígenios a procurar e os anticorpos marcados a usar, dependendo da situação do paciente e da amostra é escolhido o painel que mais se adequa [141].



Figura 34: Citómetro *BD FACSCalibur™* utilizado no laboratório de hematologia [142].

Qualquer tipo de líquido biológico pode ser estudado por citometria de fluxo, porém no laboratório de hematologia os mais frequentes são as amostras de sangue total, LBA e aspirados de medula óssea. No caso de uma amostra de sangue total, a amostra pode ser diretamente marcada com os diferentes anticorpos consoante o painel que se vai estudar, sendo os eritrócitos lisados previamente. No caso de um LBA este tem de ser primeiramente centrifugado (2000 rpm durante 5 minutos) de modo a concentrar as células, após a centrifugação o sobrenadante é descartado e é usado apenas o pellet de células que se formou, o pellet é novamente suspenso usando uma solução de PBS e é a essa nova suspensão que são adicionados os diferentes anticorpos marcados, consoante o painel a procurar [21]. No citómetro o tubo com a suspensão é colocado no injetor, que aspira a suspensão e a direciona para a área de análise onde estas são forçadas a passar, uma a uma, por um feixe de laser. No sentido horizontal da luz é avaliado o tamanho celular (FSC), e num ângulo de 90° é analisado a complexidade celular (SSC). A fluorescência dos anticorpos marcados é detetada através de fotomultiplicadores, esses fotomultiplicadores reconhecem um comprimento de onda específico, emitido

pelo fluorocromo, e convertem a intensidade desse comprimento de onda num sinal elétrico. Esse sinal elétrico é amplificado e o software do citometro converte-o num sinal digital, que permite quantificar a intensidade da fluorescência de cada fluorocromo, sendo esta usada para caracterizar e quantificar as diferentes populações celulares na amostra [139,140].

6. Conclusão e Balanço Final da Aprendizagem

A realização deste estágio permitiu-me ter a oportunidade de aprofundar os conhecimentos adquiridos ao longo da licenciatura e mestrado em Bioquímica e aplicá-los em ambiente laboral. As atividades desenvolvidas nas secções de Imunoquímica, Microbiologia e Hematologia do SPC foram fundamentais para o desenvolvimento das minhas competências técnicas e práticas.

A experiência prática permitiu-me aprimorar habilidades essenciais, como o manuseamento de equipamentos, a execução de procedimentos específicos e a interpretação de resultados. Além disso, a assimilação entre a teoria e a prática foi crucial para consolidar o meu conhecimento sobre a importância da precisão e do rigor técnico nas análises clínicas, assim como da responsabilidade que o SPC tem em assegurar que todo o processo analítico é efetuado com o máximo de qualidade e espírito crítico.

Em suma, considero ter atingido todos os objetivos propostos para este estágio, tendo este me proporcionado um grande desenvolvimento pessoal e profissional. Aprendi a trabalhar em equipa de forma eficaz, a comunicar de maneira objetiva e a resolver os problemas que apareciam com a maior eficiência. A experiência adquirida foi bastante rica, fruto das boas condições de trabalho e devido à excelente integração proporcionada por todos os colaboradores do SPC.

Bibliografia

1. Pirzadian, J., Souhoka, T., Herweijer, M., van Heel, L., van Wamel, W. J. B., Goossens, R. H. M., Severin, J. A., & Vos, M. C. (2022). Impact of sink design on bacterial transmission from hospital sink drains to the surrounding sink environment tested using a fluorescent marker. *The Journal of hospital infection*, 127, 39–43.
2. Ledwoch, K., Robertson, A., Laurant, J., Norville, P., & Maillard, J. Y. (2020). It's a trap! The development of a versatile drain biofilm model and its susceptibility to disinfection. *The Journal of hospital infection*, 106(4), 757–764.
3. Swan, J. S., Deasy, E. C., Boyle, M. A., Russell, R. J., O'Donnell, M. J., & Coleman, D. C. (2016). Elimination of biofilm and microbial contamination reservoirs in hospital washbasin U-bends by automated cleaning and disinfection with electrochemically activated solutions. *The Journal of hospital infection*, 94(2), 169–174.
4. Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., & Tanner, M. (2011). From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. *Preventive veterinary medicine*, 101(3-4), 148–156.
5. Serna, C., & Gonzalez-Zorn, B. (2022). Antimicrobial resistance and One Health. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 35 Suppl 3(Suppl 3), 37–40.
6. Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 771510.
7. Shoaib, M., Aqib, A. I., Muzammil, I., Majeed, N., Bhutta, Z. A., Kulyar, M. F., Fatima, M., Zaheer, C. F., Muneer, A., Murtaza, M., Kashif, M., Shafqat, F., & Pu, W. (2023). MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. *Frontiers in microbiology*, 13, 1067284.
8. Álvarez, A., Fernández, L., Gutiérrez, D., Iglesias, B., Rodríguez, A., & García, P. (2019). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals: Latest Trends and Treatments Based on Bacteriophages. *Journal of clinical microbiology*, 57(12), e01006-19.
9. Silva, V., Monteiro, A., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2022). MRSA in Humans, Pets and Livestock in Portugal: Where We Came from and Where We Are Going. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(10), 1110.

10. Ding, L., Shen, S., Chen, J., Tian, Z., Shi, Q., Han, R., Guo, Y., & Hu, F. (2023). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase variants: the new threat to global public health. *Clinical microbiology reviews*, 36(4), e0000823.
11. Hobson, C. A., Pierrat, G., Tenaillon, O., Bonacorsi, S., Bercot, B., Jaouen, E., Jacquier, H., & Birgy, A. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 66(9), e0044722.
12. Tsioutis, C., Eichel, V. M., & Mutters, N. T. (2021). Transmission of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: the role of infection control. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76(Suppl 1), i4–i11.
13. Mea, H. J., Yong, P. V. C., & Wong, E. H. (2021). An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiological research*, 247, 126722.
14. Yang, C. H., Su, P. W., Moi, S. H., & Chuang, L. Y. (2019). Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(10), 1849.
15. Whiteway, C., Breine, A., Philippe, C., & Van der Henst, C. (2022). *Acinetobacter baumannii*. *Trends in microbiology*, 30(2), 199–200.
16. Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C. F., & Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 170, 106103.
17. Diretrizes para a desinfecção e esterilização de infraestruturas de saúde disponível em: https://www.cdc.gov/infection-control/hcp/disinfection-sterilization/chemical-disinfectants.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html. Consultado a 20/04/2024
18. Ficha Técnica - *Klorkleen Plus (Imporquímica®)*
19. Ficha Técnica - *Granulado Desinfetante Efervescente (Agadesinfect®)*
20. Serviço de Patologia Clínica disponível em: <https://www.chcbeira.min-saude.pt/servicos-clinicos/meios-complementares-de-diagnostico-e-terapeutica/laboratorio-de-patologia-clinica/>. Consultado a 03/12/2023
21. Procedimentos Internos (Manual de Colheitas ULS Cova da Beira)
22. Procedimentos Internos (Procedimento Pré-Analítico ULS Cova da Beira)

23. Sistema Pré-analítico Roche Cobas p612. Disponível em: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-p-612-lcp1-ins-6062.html>. Consultado a 03/12/2023
24. Procedimentos Internos (Procedimento Analítico ULS Cova da Beira)
25. Procedimentos Internos (Procedimento Pós-Analítico ULS Cova da Beira)
26. Roche Cobas® 8000. disponível em: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas-8000-analyzer-series-sys-128.html>. Consultado a 03/12/2023
27. Roche Cobas 8000. (Manual de Utilizador)
28. Roche Cobas® 8000. Módulo c502 disponível em: <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/instruments/cobas-c-502-ins-2113.html>. Consultado a 03/12/2023
29. Roche Cobas® 8000. Módulo c 502 (Bulas)
30. Roche Cobas® 8000. Modulo e 602 (Bulas)
31. Roche Cobas® e 411 (Bulas)
32. Abbott Architect i2000SR disponível em: <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/architect/architect-i2000SR.html#>. Consultado a 05/12/2023
33. Abbott Architect i2000SR (Bulas)
34. ImmunoCAP™ 250 disponível em: <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/pt/our-solutions/phadia-laboratory-systems/phadia-250.html>. Consultado a 05/12/2023
35. ImmunoCAP™ 250 (Bulas)
36. Atellica® NEPH 630 System disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/plasma-protein/systems/atellica-neph-630-system>. Consultado a 05/12/2023
37. Atellica® NEPH 630 System (Bulas)
38. Sebia CAPILLARYS 3 OCTA disponível em: <https://www.sebia.com/pt-pt/instruments/capillarys-3-octa/>. Consultado a 05/12/2023
39. Sebia CAPILLARYS 3 OCTA (Bulas)
40. Sebia HYDRASYS FOCUSING disponível em: <https://www.sebia.com/pt-pt/instruments/hydrasys-2-scan-focusing/>. Consultado a 05/12/2023
41. Sebia HYDRASYS FOCUSING (Bulas)
42. Atellica® 1500 Automated Urinalysis System disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/urinalysis/systems/atellica-1500-automated-urinalysis-system>. Consultado a 06/12/2023
43. Protocolos Internos (Testes Rápidos Drogas de Abuso e Testes de Gravidez)

44. Jorge, R. (2004) Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Programa Nacional de Controlo de Infecção. Microbiologia.
45. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology Eleventh edition
46. Urina - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
47. Certest Biotec S.Pneumoniae + Legionella (Bula)
48. Fezes - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
49. NADAL® FOB test (Bula)
50. Rapid-VIDITEST Crypto-Giardia® (Bula)
51. StorAX SAF® (Bula)
52. CerTest Rotavírus e Adenovírus (Bula)
53. RIDA®QUICK Norovírus (Bula)
54. CerTest BIOTEC Clostridium difficile GDH + Toxin A + Toxin B (Bula)
55. Pylori-Strip Coris BioConcept (Bula)
56. Expetorações e Secreções Brônquicas - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
57. Lavado Bronco-Alveolar (LBA) e Aspirado Brônquico - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
58. Hemoculturas - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
59. Biomérieux. BACT/ALERT® 3D. disponível em <https://www.biomerieux-industry.com/products/bact/alert-3d-rapid-microbial-detection>. Consultado a 02/03/2024
60. Cateter - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
61. Exsudado Vaginal e Uretral - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
62. Exsudado Nasal - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
63. Pesquisa de Streptococcus agalactiae - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
64. Pesquisa de Acinetobacter baumannii - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
65. Líquido Pleural e Ascítico - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
66. Líquido Cefalorraquidiano - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
67. Líquido Pericárdico - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
68. Líquido Articular/Sinovial - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)

69. Pus - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
70. Biópsia - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
71. Colorações usadas em microbiologia disponível em https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Artigos_cientificos/3-Coloracao_microbiologia.pdf. Consultado a 07/03/2024
72. Pereira, Francisco. (2020). MICROBIOLOGY LABORATORY.(In Portuguese). LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA.10.13140/RG.2.2.19169.25445.
73. PREVI® Color Gram disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/previr-color-gram>. Consultado a 07/03/2024
74. Aerospray® TB Slide Stainer / Cytocentrifuge disponível em <https://www.aerospraystaining.com/tb.php>. Consultado a 07/03/2024
75. Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *BioTechniques*, 69(4), 317–325.
76. GeneXpert® disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/systems/genexpert-family-of-systems/genexpert-system.html>. Consultado a 08/03/2024
77. Biologia Molecular - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
78. Teste Xpert® MTB/RIF disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/tb-emerging-infectious-diseases/xpert-mtb-rif-ultra.html>. Consultado a 08/03/2024
79. Teste Xpert® Carba-R disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/hai-other-infectious-diseases/xpert-carba-r.html>. Consultado a 08/03/2024
80. Teste Xpert® MRSA NxG disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/hai-other-infectious-diseases/xpert-mrsa-nxg.html>. Consultado a 08/03/2024
81. Teste Xpert® CT/NG disponível em <https://www.cepheid.com/en-US/tests/blood-virology-womens-health-sexual-health/xpert-ct-ng.html>. Consultado a 08/03/2024
82. McPherson RA, Msc MD, Pincus MR. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Elsevier Health Sciences, Vol 125; 2016.
83. Yagupsky, P., Morata, P., & Colmenero, J. D. (2019). Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00073-19.
84. Rosa Bengala - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
85. Pavone, P., Gulizia, C., D'Amico, S., Grassi, P., La Rosa, G., Leotta, R., Basile, A., Palmucci, S., Foti, P. V., Belfiore, G., Marino, L., Pellicanò, G. F., & Pulvirenti, G.

- (2022). Splenic abscesses in childhood brucellosis: a case-based review. *European review for medical and pharmacological sciences*, 26(13), 4863–4871.
86. Widal-Wright - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
 87. Lum, B., & Sergent, S. R. (2023). Rapid Plasma Reagin. In StatPearls. StatPearls Publishing.
 88. VDRL e RPR - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
 89. Testes Manuais - Procedimentos Internos Microbiologia (ULS Cova da Beira)
 90. Kit Tipagem disponível em <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R62025>. Consultado a 09/03/2024
 91. Teste rápido pesquisa de MRSA disponível em https://content.veeabb.com/1d09429b-8373-419f-8f1a-d28f9586863a/13940b04-44f2-4bd2-bbc8-3d303cbf918b/13940b04-44f2-4bd2-bbc8-3d303cbf918b_source__v.pdf. Consultado a 09/03/2024
 92. Etest® disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/etestr>. Consultado a 09/03/2024
 93. BioMérieux. VITEK®2 COMPACT disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-compact>. Consultado a 09/03/2024
 94. BioMérieux. Cartas ID disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-id-cards>. Consultado a 09/03/2024
 95. BioMérieux. Cartas TSA disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek-2-ast-cards#top>. Consultado a 09/03/2024
 96. BBL Cooked Meat Medium disponível em <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22256>. Consultado a 10/03/2024
 97. BBL Todd Hewitt Broth disponível em <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22908>. Consultado a 10/03/2024
 98. TETRATHIONATE BROTH BASE disponível em http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0029&org=124&c=UK&lang=EN. Consultado a 10/03/2024
 99. LOWENSTEIN - JENSEN MEDIUM disponível em https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7245_pt_pi.pdf. Consultado a 10/03/2024
 100. Biomerieux. Meios de cultura sólidos disponível em <https://www.biomerieux-culturemedia.com/#>. Consultado a 10/03/2024

101. Hoffbrand A., Moss P. Fundamentos Em Hematologia. Artmed Editora 7^o Edição, 2017
102. Teste Xpert[®] HemosIL FII & FV disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/oncology-human-genetics/xpert-fii-fv.html>. Consultado a 11/05/2024
103. Teste Xpert[®] BCR-ABL Ultra disponível em <https://www.cepheid.com/pt-PT/tests/oncology-human-genetics/xpert-bcr-abl-ultra.html>. Consultado a 11/05/2024
104. Khider, L., Gendron, N., & Mauge, L. (2022). Inherited Thrombophilia in the Era of Direct Oral Anticoagulants. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1821.
105. Castoldi, E., Simioni, P., Kalafatis, M., Lunghi, B., Tormene, D., Girelli, D., Girolami, A., & Bernardi, F. (2000). Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood*, 96(4), 1443–1448.
106. Carofiglio, F., Lopalco, A., Lopedota, A., Cutrignelli, A., Nicolotti, O., Denora, N., Stefanachi, A., & Leonetti, F. (2020). Bcr-Abl Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Pediatric CML. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4469.
107. Sediplus[®] S 2000 disponível em https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Bedienungsanleitungen/Instruction_Manual_Sediplus_R__S_2000__230V_90.189.700.pdf. Consultado a 12/05/2024
108. ADAMS[™] A1c HA-8180T, ARKRAY disponível em <https://www.arkray.eu/pt/english/products/diabetes/habalc/ha-8180t.html>. Consultado a 12/05/2024
109. van der Hagen, E. A. E., Leppink, S., Bokkers, K., Siebelder, C., & Weykamp, C. W. (2020). Evaluation of the ARKRAY HA-8190V instrument for HbA1c. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 59(5), 965–970.
110. Ugwu, N. I., Ikeagwulonu, U. U., Madu, A. J., Okoye, H. C., & Alo10, C. (2021). Chromatographic pattern of haemoglobin (Hb) types (HbS, HbA2 and HbF) among individuals with sickle cell anaemia and those with sickle cell trait in a tertiary health institution, South eastern Nigeria. *Afr. J. Med. Med. Sci*, 50.
111. Mahadevarao Premnath, S., & Zubair, M. (2024). Chromatography. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
112. Lours, C., Cottin, L., Wiber, M., Andrieu, V., Baccini, V., Baseggio, L., Brouzes, C., Chatelain, B., Daliphard, S., Fenneteau, O., Geneviève, F., Girard, S.,

- Leymarie, V., Maloum, K., Rieu, J. B., Sebahoun, G., Sudaka, I., Troussard, X., Wagner-Ballon, O., Wulleme, S., ... Lesesve, J. F. (2022). Perls' Stain Guidelines from the French-Speaking Cellular Hematology Group (GFHC). *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1698.
113. Grigorev, I. P., & Korzhevskii, D. E. (2021). Modern Imaging Technologies of Mast Cells for Biology and Medicine (Review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine*, 13(4), 93–107.
114. Coloração May-Grunwald-Giemsa disponível em <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/03/172158.pdf>. Consultado a 12/05/2024
115. Dhinakaran, S., Mahadevan, A., Unchagi, A., Kulkarni, G. B., Nagappa, M., Chickabasaviah, Y. T., Sankaran, B. P., Taly, A. B., & Shankar, S. K. (2021). Is Perls Prussian Blue Stain for Hemosiderin a Useful Adjunct in the Diagnosis of Vasculitic Neuropathies?. *Neurology India*, 69(1), 140–146.
116. CellaVision® DC-1 disponível em <https://www.cellavision.com/products/hardware/cellavisionr-dc-1>. Consultado a 13/05/2024
117. Horiba Yumizen SPS disponível em <https://www.horiba.com/int/medical/products/detail/action/show/Product/yumizen-sps-476/>. Consultado a 13/05/2024
118. Arishi, W. A., Alhadrami, H. A., & Zourob, M. (2021). Techniques for the Detection of Sickle Cell Disease: A Review. *Micromachines*, 12(5), 519.
119. ACL TOP 750 disponível em <https://www.werfen.com/pt/pt-pt/hemostase/familia-acl-top-serie-50>. Consultado a 14/05/2024
120. ACL TOP 750 (Bula)
121. Yang, R., Zubair, M., & Moosavi, L. (2024). Prothrombin Time. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
122. Santoro, R. C., Molinari, A. C., Leotta, M., & Martini, T. (2023). Isolated Prolongation of Activated Partial Thromboplastin Time: Not Just Bleeding Risk!. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(6), 1169.
123. Johnson, E. D., Schell, J. C., & Rodgers, G. M. (2019). The D-dimer assay. *American journal of hematology*, 94(7), 833–839.
124. May, J. E., Wolberg, A. S., & Lim, M. Y. (2021). Disorders of Fibrinogen and Fibrinolysis. *Hematology/oncology clinics of North America*, 35(6), 1197–1217.
125. Baker, P., Platton, S., Gibson, C., Gray, E., Jennings, I., Murphy, P., Laffan, M., & British Society for Haematology, Haemostasis and Thrombosis Task Force

- (2020). Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *British journal of haematology*, 191(3), 347–362.
126. Middeldorp, S., Nieuwlaat, R., Baumann Kreuziger, L., Coppens, M., Houghton, D., James, A. H., Lang, E., Moll, S., Myers, T., Bhatt, M., Chai-Adisaksopha, C., Colunga-Lozano, L. E., Karam, S. G., Zhang, Y., Wiercioch, W., Schünemann, H. J., & Iorio, A. (2023). American Society of Hematology 2023 guidelines for management of venous thromboembolism: thrombophilia testing. *Blood advances*, 7(22), 7101–7138.
 127. Bianchini E. P. (2022). Antithrombin deficiency: no sugar, no diagnosis!. *Blood*, 140(2), 83–85.
 128. Dinarvand, P., & Moser, K. A. (2019). Protein C Deficiency. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 143(10), 1281–1285.
 129. Gupta, A., Tun, A. M., Gupta, K., & Tuma, F. (2022). Protein S Deficiency. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
 130. Favaloro, E. J., & Pasalic, L. (2022). Lupus anticoagulant testing during anticoagulation, including direct oral anticoagulants. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, 6(2), e12676.
 131. Ahuja, A., Tyagi, S., Pati, H. P., Saxena, R., Somasundaram, V., Manivannan, P., Tripathi, P., & Chandra, D. (2019). Utility of Lupus Anticoagulant Assays (APTT-LA, KCT, DPT and DRVVT) in Detection of Antiphospholipid Syndrome (APS) in High Risk Pregnancy Cases. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*, 35(3), 478–484.
 132. Devreese, K. M. J., de Groot, P. G., de Laat, B., Erkan, D., Favaloro, E. J., Mackie, I., Martinuzzo, M., Ortel, T. L., Pengo, V., Rand, J. H., Tripodi, A., Wahl, D., & Cohen, H. (2020). Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 18(11), 2828–2839.
 133. Manz, X. D., Bogaard, H. J., & Aman, J. (2022). Regulation of VWF (Von Willebrand Factor) in Inflammatory Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 42(11), 1307–1320.
 134. Celkan T. T. (2020). What does a hemogram say to us?. *Turk pediatri arsivi*, 55(2), 103–116.

135. Horiba Yumizen H2500 disponível em <https://www.horiba.com/bra/medical/products/detail/action/show/Product/yumizen-h2500-h1500-1856/>. Consultado a 15/05/2024
136. Bhola, R.K., Fudaly, C. & Rastogi, S. A Comparative Evaluation of Performance of Sysmex XN 3000 and Horiba Yumizen H2500 Automated Complete Blood Count Analysers. *Indian J Hematol Blood Transfus* (2023).
137. Granulócitos disponível em https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Medical/Yumizen_BIO/Immature_Granulocyte/Immature_Granulocyte_Yumizen_BIO_HORIBA_Medical_2023.pdf. Consultado a 15/05/2024
138. Plaquetograma disponível em https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Medical/Yumizen_BIO/Large_Platelet_Fraction/Large_Platelet_Fraction_Yumizen_BIO_HORIBA_Medical__2023_.pdf. Consultado a 15/05/2024
139. Robinson J. P. (2022). Flow cytometry: past and future. *BioTechniques*, 72(4), 159–169.
140. Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B., & Fischer, R. (2023). Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells*, 12(14), 1875.
141. Procedimentos Internos - Laboratório de Hematologia (ULS Cova da Beira)
142. BD FACSCalibur™ disponível em <https://sites.icb.ufmg.br/celam/citometria/equipamentos/bd-facscalibur/>. Consultado a 15/05/2024
143. Zou, Q., Meng, W., Wang, C., Wang, T., Liu, X., & Li, D. (2023). Sodium dichloroisocyanurate: improving broiler health by reducing harmful microbial levels in the waterline. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1234949.
144. Damiano, P., Silago, V., Nyawale, H. A., Mushi, M. F., Mirambo, M. M., Kimaro, E. E., & Mshana, S. E. (2023). Efficacy of disinfectants on control and clinical bacteria strains at a zonal referral hospital in Mwanza, Tanzania: a cross sectional hospital-based study. *Scientific reports*, 13(1), 17998.