



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Joana Lusio Ferreira

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. António Gomes Fernandes e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2022





Joana Lusio Ferreira

# Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular, realizado no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF em Viseu, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. António Gomes Fernandes e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2022



*“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”*

Marie Curie



## Agradecimentos

---

Chegou ao fim mais uma etapa e não podia deixar de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam ao longo deste percurso, todas de uma maneira ou de outra nunca me deixaram desistir nos dias difíceis e sempre me incentivaram a seguir os meus objetivos.

Aos meus pais agradeço por todo o apoio, compreensão e por todo o esforço que fazem para que eu possa ter oportunidade de estudar e concretizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos, Mariana e Filipe, agradeço toda a paciência que têm para a vossa irmã do meio e por fazerem parte da minha vida.

Agradeço ao namorado, o Nelson que é o meu pilar e conselheiro de todas as horas, que ao longo destes anos sempre acompanhou todas as fases da minha vida com a maior compreensão e paciência.

À Professora Doutora Ana Miguel, agradeço por todo o apoio e orientação ao longo destes meses de elaboração do relatório.

Ao Dr. António Fernandes, agradeço a hospitalidade com que me recebeu numa altura pandémica complicada e pela orientação, disponibilidade e ajuda ao longo do estágio.

À equipa do Laboratório Germano de Sousa em Viseu, à Raquel, à Catarina, à Isabel, à Marta, à Teresa, à Vera, à Andreia, à Adriana, à Jacinta, à Flávia e à Sandra agradeço por todo o carinho, disponibilidade e pela forma como me integraram na equipa e me orientaram ao longo do meu percurso.

À minha querida amiga Susana, a pessoa que vivenciei comigo a vida académica, que esteve lá nos momentos difíceis longe de casa, nas sessões de estudos e nos momentos de lazer e que apesar da distância continua a dar-me um apoio excecional.

Às amigas de Coimbra, à Mara amiga desde o liceu agradeço por todo o apoio e carinho. À Daniela que tive o privilégio de conhecer na minha curta passagem por Coimbra e que se tornou muito especial. Sem elas a realização deste mestrado não teria sido a mesma.



# Índice

---

Agradecimentos .....	v
Índice .....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xii
Resumo .....	xiii
Abstract .....	xv
<b>Capítulo I – Relatório de Estágio em Análises Clínicas</b>	
Lista de Abreviaturas .....	3
1. Introdução.....	5
2. Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa .....	6
2.1. Caracterização do laboratório .....	6
2.2. Organização e sectorização do laboratório .....	6
2.3. Fluxo de amostras .....	6
2.3.1. Fase Pré-Analítica.....	7
2.3.2. Fase Analítica.....	8
2.3.3. Fase Pós-Analítica .....	9
2.4. Controlo de qualidade .....	10
2.4.1. Controlo de qualidade interno.....	10
2.4.2. Avaliação externa da qualidade .....	11
3. Imunologia .....	11
4. Bioquímica .....	12
5. Microbiologia .....	14
5.1. Exame microscópico direto .....	15
5.2. Exame Cultural .....	15
5.3. Provas Complementares de Diagnóstico.....	16
5.4. Técnicas Imunológicas.....	17
5.5. Identificação microbiana e testes de suscetibilidade antimicrobiana .....	18
5.5.1. VITEK® 2 COMPACT.....	18
5.6. Produtos Biológicos para análise microbiológica .....	19
5.6.1. Amostras do trato urinário .....	19
5.6.1.1. Urina.....	20
5.6.1.1.1 Urina tipo II .....	20
5.6.1.1.2 Sedimento Urinário .....	20
5.6.1.1.3 Urocultura.....	21
5.6.2. Amostras do trato gastrointestinal .....	22
5.6.2.1 Fezes.....	23
5.6.2.1.1 Coprocultura.....	23
5.6.2.1.2 Exame parasitológico de fezes.....	24
5.6.3. Amostras do trato genital.....	25
5.6.3.1 Exsudado vaginal.....	25
5.6.3.1.1 Exame Microscópico .....	26
5.6.3.1.2 Exame Cultural.....	26

5.6.3.1.3 Pesquisa de <i>Streptococcus</i> do Grupo B.....	27
5.6.3.2. Exsudado Uretral.....	28
5.6.3.2.1 Exame Microscópico .....	28
5.6.3.2.2 Exame Cultural .....	28
5.6.4. Amostras do trato respiratório .....	28
5.6.4.1. Amostras do trato respiratório superior.....	29
5.6.4.1.1 Exsudado faríngeo.....	29
5.6.4.1.1.1 Pesquisa de MRSA.....	29
5.6.4.1.2 Exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo.....	30
5.6.4.2. Amostras do trato respiratório inferior .....	31
5.6.4.2.1 Expetoração, secreções brônquicas e lavados brônquicos .....	31
5.6.4.2.1.1 Pesquisa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	33
5.6.5. Amostras da pele e de tecidos moles.....	34
5.6.5.1 Exsudados de feridas e exsudados purulentos .....	35
5.6.6. Hemocultura .....	35
5.6.7. Líquidos de cavidades serosas .....	36
6. Hematologia.....	37
6.1. Hematopoiese .....	38
6.1.1. Eritropoiese .....	39
6.1.2. Leucopoiese .....	39
6.1.3. Trombopoiese .....	39
6.2. Hemograma .....	39
6.2.1. Eritrograma .....	41
6.2.1.1. Contagem total de Eritrócitos .....	41
6.2.1.2. Concentração de Hemoglobina .....	42
6.2.1.3. Hematócrito .....	42
6.2.1.4. Constantes eritrocitárias .....	42
6.2.1.5. Contagem de reticulócitos .....	43
6.2.1.6. Contagem de NRBC .....	44
6.2.2. Leucograma.....	44
6.2.3. Trombocitograma.....	45
6.3. Esfregaço de Sangue periférico .....	46
6.3.1. Eritrócitos .....	47
6.3.2. Leucócitos.....	49
6.3.3. Plaquetas.....	50
6.4. Hemóstase e Coagulação .....	50
6.4.1. Testes de avaliação da coagulação .....	51
6.4.1.1. Tempo de Protrombina (PT).....	52
6.4.1.2. Tempo de Tromboplastina parcial ativada (TTPa) .....	52
6.5. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária.....	52
6.6. Hemoglobina Glicada .....	53
7. Conclusão.....	54
8. Bibliografia.....	55
9. Anexos .....	65
9.1. Anexo I: Técnicas utilizadas para a realização do esfregaço bacteriano.....	65

9.2. Anexo II: Meios Utilizados em Microbiologia no CMLGS em Viseu .....	65
9.3. Anexo III: Coloração de Gram.....	67
9.4. Anexo IV: Coloração de Ziehl-Neelsen.....	67
9.5. Anexo V: Esfregaço de Sangue periférico e coloração de Wright.....	68
<b>Capítulo II – Antibiotic pattern of <i>Escherichia coli</i> and <i>Escherichia coli</i> producing extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamases in urine samples</b>	
List of Abbreviations .....	71
Abstract .....	73
Resumo .....	75
1. Introduction .....	77
2. Materials and Methods .....	78
2.1. Sampling collection.....	78
2.2. Microbiological analysis.....	79
2.3. Susceptibility patterns .....	79
2.4. Determination of multidrug-resistant strains .....	80
2.5. Statistical analysis.....	80
3. Results .....	80
3.1. Demographic characteristics .....	80
3.2. <i>Escherichia coli</i> isolates characteristics .....	80
3.3. Antibiotic pattern .....	81
3.4. Multidrug-resistant bacteria .....	80
4. Discussion and conclusions .....	83
5. Bibliography.....	87



## Índice de Figuras

---

### Capítulo I – Relatório de Estágio em Análises Clínicas

<b>Figura 1:</b> Fluxograma das amostras no CMLGS em Viseu .....	7
<b>Figura 2:</b> Código alfanumérico atribuído às amostras no CMLGS em Viseu .....	7
<b>Figura 3:</b> Observação ao microscópio ótico de sedimento urinário com a ampliação de 40x.....	21
<b>Figura 4:</b> Colónias com diferentes morfologias no meio ChromID CPS Elite.....	22
<b>Figura 5:</b> Observação microscópica de esfregaço em coloração de Gram de um exsudado vaginal com a ampliação de 100x. ....	26
<b>Figura 6:</b> Exame cultural em ChromID Strep B para pesquisa de <i>Streptococcus</i> do grupo B.....	27
<b>Figura 7:</b> Diagnóstico laboratorial de Secreção Brônquica.....	32
<b>Figura 8:</b> Diagrama esquemático da hematopoiese. ....	38
<b>Figura 9:</b> Eritroblasto em esfregaço de sangue periférico com coloração de Wright e visualização com a objetiva de 100x.....	44
<b>Figura 10:</b> Observação microscópica de esfregaços de sangue periférico em coloração de Wright.....	47
<b>Figura 11:</b> Observação microscópica de esfregaço de sangue periférico em coloração de Wright de um doente com Mieloma Múltiplo... ..	48
<b>Figura 12:</b> Morfologia dos Leucócitos em microscopia ótica .....	49
<b>Figura 13:</b> Esfregaço de sangue periférico de pseudotrombocitopénia.....	50
<b>Figura 14:</b> Representação da cascata da coagulação <i>in vivo</i> .....	51
<b>Figura 15:</b> Diferentes técnicas utilizadas no CMLGS em Viseu para a obtenção do esfregaço bacteriano.....	65
<b>Figura 16:</b> Procedimento da coloração de Gram realizada no CMLGS em Viseu através de reagentes da casa comercial bioMérieux.....	67
<b>Figura 17:</b> Procedimento laboratorial da coloração de Ziehl-Neelsen no CMLGS em Viseu... ..	67
<b>Figura 18:</b> Procedimento da realização de esfregaços sanguíneos e coloração de Wright no CMLGS em Viseu.....	68

### Capítulo II – Antibiotic pattern of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* producing extended-spectrum $\beta$ -lactamases in urine samples

<b>Figure 1:</b> Percentage of isolates resistant to the antibiotics tested .....	82
---	----

## Índice de Tabelas

---

### Capítulo I – Relatório de Estágio em Análises Clínicas

<b>Tabela I:</b> Distribuição dos equipamentos nas diferentes áreas analíticas no CMLGS em Viseu .....	9
<b>Tabela II:</b> Parâmetros analisados nas técnicas automatizadas de Imunologia e a respetiva metodologia. ....	12
<b>Tabela III:</b> Técnicas serológicas manuais disponíveis no laboratório para a avaliação de doenças infecciosas. ....	12
<b>Tabela IV:</b> Equipamentos de Bioquímica e a metodologia usada para a determinação dos vários analitos.....	13
<b>Tabela V:</b> Provas complementares de diagnóstico disponíveis no CMLGS em Viseu. ....	16
<b>Tabela VI:</b> Testes imunocromatográficos disponíveis no CMLGS em Viseu para o diagnóstico de microrganismos. ....	17
<b>Tabela VII:</b> Cartas disponíveis para o equipamento VITEK® 2 COMPACT para a identificação bacteriana e os testes de suscetibilidade antibacteriana no CMLGS em Viseu.....	19
<b>Tabela VIII:</b> Critérios de Murray e Washington para a avaliação da qualidade de amostra do trato respiratório inferior. ....	32
<b>Tabela IX:</b> Parâmetros analisados no hemograma pelos equipamentos Sysmex XT-4000i™ e Sysmex XT-I800i™, e as respetivas metodologias.....	41
<b>Tabela X:</b> Classificação da Anemia com base nas constantes eritrócitárias .....	43
<b>Tabela XI:</b> Principais alterações quantitativas nos leucócitos e as causas mais frequentes..	45
<b>Tabela XII:</b> Principais causas das alterações quantitativas das plaquetas.....	46
<b>Tabela XIII:</b> Alterações na forma dos eritrócitos e causas mais frequentes.....	48
<b>Tabela XIV:</b> Meios líquidos e sólidos disponíveis para o exame cultural no CMLGS em Viseu. ....	65

### Capítulo II – Antibiotic pattern of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* producing extended-spectrum $\beta$ -lactamases in urine samples

<b>Table I:</b> Demographics characteristics of urine samples.....	81
<b>Table II:</b> Demographic characteristics of MDR isolates in urine samples.....	83

## Resumo

---

O presente relatório de estágio pretende descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular no âmbito do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio curricular decorreu no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF em Viseu durante 6 meses. Neste período, o contacto com a rotina diária do laboratório foi essencial para a consolidação dos conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do mestrado. O estágio permitiu a integração na equipa técnica com a oportunidade de participar nas manutenções dos diversos equipamentos, no controlo de qualidade, efetuar inúmeros procedimentos laboratoriais, assim como a observação na validação técnica e biopatológica.

Este documento dividido em dois capítulos, realiza primeiramente uma breve descrição sobre o fluxo de trabalho do laboratório e das áreas analíticas de Imunologia e Bioquímica, seguida de uma descrição detalhada das áreas de Microbiologia e Hematologia. Adicionalmente, foi realizado um estudo retrospectivo das amostras com uroculturas positivas do laboratório de estágio cujo objetivo, foi avaliar os isolados de *Escherichia coli* e os respetivos padrões de suscetibilidade antibacteriana.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas, Hematologia, Microbiologia, Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, Hospital CUF, Infecções do trato urinário, *Escherichia coli*, Resistência a antibióticos.



## Abstract

---

This report describes the activities developed during the curricular internship within the scope of the master's degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra. The curricular internship took place at the Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa at the CUF Hospital in Viseu for 6 months. During this period the contact with the daily routine of the laboratory was essential for the consolidation of theoretical and practical knowledge acquired during the master's degree. The internship allowed integration into the technical team with the opportunity to participate in the maintenance of the various equipment, quality control, perform several laboratory procedures, as well as observation in technical and biopathological validation.

This document is divided into two chapters, firstly describes the workflow of the laboratory and the analytical areas of Immunology and Biochemistry, followed by a detailed description of the Microbiology and Hematology areas. In addition, a retrospective study was performed using laboratory positive urine culture samples. The aim of this study was to evaluate *Escherichia coli* isolates and their antibacterial susceptibility patterns.

**Keywords:** Clinical Analysis, Hematology, Microbiology, Germano de Sousa, CUF Hospital, Urinary tract infection, *Escherichia coli*, Antibiotic resistance.



## **Capítulo I**

### **Relatório de Estágio em Análises Clínicas**



## Lista de Abreviaturas

---

<b>AEQ:</b> Avaliação Externa da Qualidade	<b>Hb:</b> Hemoglobina
<b>Ag:</b> Antígeno	<b>HbA<sub>1c</sub>:</b> Hemoglobina Glicada
<b>BHI-T:</b> Caldo Coração-Cérebro	<b>Hbs:</b> <i>Hepatitis B Surface</i>
<b>CA125:</b> <i>Cancer Antigen 125</i>	<b>HCM:</b> Hemoglobina Corpuscular Média
<b>CAM:</b> Gelose <i>Campyloset</i>	<b>Hct:</b> Hematócrito
<b>CEA:</b> <i>Carcinoembryonic Antigen</i>	<b>HCV:</b> <i>Hepatitis C virus</i>
<b>CHCM:</b> Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	<b>HEKT:</b> Gelose Hektoen
<b>CK-MB:</b> <i>Creatine phosphokinase MB isoenzyme</i>	<b>HIV:</b> <i>Human immunodeficiency virus</i>
<b>CMI:</b> Concentração Mínima Inibitória	<b>HPLC:</b> <i>High performance liquid chromatography</i>
<b>CMLGS:</b> Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa	<b>HSCs:</b> <i>Hematopoietic stem cells</i>
<b>CNA:</b> Gelose Colombia ANC+ 5% Sangue de Carneiro	<b>hs-cTnI:</b> <i>High sensitivity cardiac troponin I</i>
<b>COS:</b> Gelose de Colombia + 5% de Sangue de Carneiro	<b>HSV:</b> <i>Herpes simplex virus</i>
<b>COVID-19:</b> <i>Coronavirus Disease 2019</i>	<b>IG:</b> Granulócitos imaturos
<b>CPSE:</b> Gelose ChromID CPS Elite	<b>IgA:</b> Imunoglobina A
<b>CQI:</b> Controlo de Qualidade Interno	<b>IgG:</b> Imunoglobina G
<b>DNA:</b> <i>Deoxyribonucleic Acid</i>	<b>INR:</b> <i>International Normalized Ratio</i>
<b>DST:</b> Doenças sexualmente transmissíveis	<b>ITU:</b> Infecções do Trato Urinário
<b>EDTA:</b> <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>	<b>LCR:</b> Líquido Cefalorraquidiano
<b>ELFA:</b> <i>Enzyme-linked fluorescent assay</i>	<b>LJ-T:</b> Meio Löwenstein-Jensen
<b>EUCAST:</b> <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	<b>MCK:</b> Gelose de <i>MacConkey</i>
<b>fPSA:</b> <i>Free Prostate-Specific Antigen</i>	<b>MRSA:</b> <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>FSC:</b> <i>Forward scatter</i>	<b>MSA2:</b> Gelose de <i>Chapman</i>
<b>FSH:</b> <i>Follicle Stimulating Hormone</i>	<b>NRBC:</b> <i>Nucleated Red Blood Cells</i>
<b>GDH:</b> Glutamato desidrogenase	<b>NT-proBNP:</b> <i>N-terminal pro-B-type natriuretic peptide</i>
<b>HAE2:</b> Gelose de Chocolate <i>Haemophilus 2</i>	<b>PLT:</b> Plaquetas
	<b>PNAEQ:</b> Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
	<b>PSA:</b> <i>Prostate-specific antigen</i>

**PT:** *Prothrombin time*

**PVX:** Gelose de Chocolate *Polyvitex*

**RBC:** *Red blood cells*

**RDW:** *Red cell distribution width*

**RET:** Reticulócitos

**RNA:** *Ribonucleic acid*

**RT-PCR:** *Reverse*

*transcription polymerase chain reaction*

**SARS-CoV-2:** *Severe Acute*

*Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

**Selenito F-T:** Caldo Selenito-F

**SEQC:** *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*

**SGC2:** Gelose *Sabouraud*

*Gentamicina Cloranfenicol 2*

**SLS:** *Sodium lauryl sulphate*

**SSC:** *Side scatter*

**STRPB:** Gelose ChromID Strep B

**T3:** Triiodotironina

**T4:** Tiroxina

**TAT:** *Turn Around Time*

**TODD H-T:** Caldo Todd-Hewitt +  
*Antibióticos*

**TPHA:** *Treponema Pallidum Hemagglutination Assay*

**TSDT:** Técnico superior de diagnóstico e terapêutica

**TSH:** *Thyroid stimulating hormone*

**TTPa:** Tempo de tromboplastina parcial ativada

**UFC:** Unidade Formadora de Colônias

**UK-NEQAS:** *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

**VB12:** Vitamina B12

**VCAT:** Gelose de Chocolate *Polyvitex*

**VCM:** Volume Corpuscular Médio

**VDRL:** *Venereal Disease Research Laboratory*

**WBC:** *White blood cells*

**β- HCG:** *Beta human chorionic gonadotropin*

## I. Introdução

---

O Homem procura respostas para compreender o mundo que o rodeia, nomeadamente a nível da saúde e da fisiologia humana, desde o início dos tempos. Existem registos, que datam a 4000 a.C, de observações na cor e aspeto da urina pelo povo babilónico e sumeriano [1] assim como do povo Hindu (entre 400 a.C e 500 a.C), a descreverem que a urina de alguns indivíduos apresentava um sabor doce, e que as formigas eram atraídas para esse local [2]. Estes povos registaram aquilo que mais tarde se verificou ser uma condição de Diabetes *Mellitus* [3].

A origem dos laboratórios de Análises Clínicas teve início no Séc. XIX, época em que o diagnóstico laboratorial revelou ser uma etapa importante na medicina. Desde então, ocorreram uma série de etapas até efetivamente o laboratório se tornar um espaço físico e indispensável em hospitais [4]. Na década de 90, os laboratórios de Análises Clínicas sofreram um grande desenvolvimento, impulsionado pela evolução tecnológica, surgindo a automação laboratorial, fundamental não só para minimizar erros, melhorando a exatidão e a precisão dos resultados, mas também garantir uma maior rapidez e segurança para os técnicos [5].

Atualmente, vivemos numa situação pandémica que tem evidenciado ainda mais a importância da ciência na sociedade, nomeadamente no diagnóstico clínico. A deteção do SARS-CoV-2 através de diversos testes laboratoriais, como é o caso do RT-PCR, é fundamental para controlar a disseminação viral na comunidade e a doença de COVID-19, contribuindo para minimizar assim as consequências para a saúde pública e económicas a nível mundial [6].

O mestrado em Análises Clínicas, com a duração de 2 anos, é multidisciplinar e permite a aprendizagem das diversas valências analíticas. O primeiro ano destina-se principalmente à componente teórica, enquanto no segundo ano a componente prática permite consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos neste ciclo de estudos assim como, conhecer a realidade no mercado de trabalho. O estágio reportado neste relatório teve uma duração de cerca de 6 meses, e decorreu no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Hospital CUF em Viseu, onde foi possível integrar a equipa técnica e conhecer a realidade do laboratório, assim como a sua rotina diária.

## 2. Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa

---

### 2.1. Caracterização do laboratório

O Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CMLGS) é uma rede de laboratórios com mais de 45 anos de história, com cerca de 22 laboratórios a nível nacional, que suportam as análises laboratoriais de 12 hospitais e de cerca de 550 postos de colheita [7].

O Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa em Viseu é um dos laboratórios a nível nacional e está inserido no Hospital CUF. O diretor técnico, Dr. António Gomes Fernandes, farmacêutico especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pela ordem dos Farmacêuticos, é o responsável técnico dos vários setores, assim como o coordenador da gestão de qualidade do laboratório. A equipa técnica é constituída por um técnico superior e sete técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica (TSDT).

### 2.2. Organização e sectorização do laboratório

Este laboratório é organizado com base nas várias etapas do procedimento laboratorial e por isso é constituído pela receção, gabinete de direção técnica e por diversas salas: descanso da equipa técnica, triagem, lavagem, sujos, Microbiologia, Hematologia, Serologia e uma divisão em *open space* polivalente que concentra as áreas analíticas de Bioquímica, Imunologia, Hemóstase e análise de urina tipo II.

### 2.3. Fluxo de amostras

O laboratório garante a análise laboratorial dos vários serviços do Hospital CUF e de ambulatório, a nível regional, com cerca de 40 postos de colheita distribuídos no interior e exterior do distrito de Viseu. Somado a estes serviços, tem ainda parcerias com algumas empresas assegurando a análise no âmbito da medicina do trabalho assim como a realização de colheitas ao domicílio.

O fluxo de amostras diárias é, em média, cerca de 420 de ambulatório e 30 a nível hospitalar. Devido à situação pandémica atual, assegura cerca de 10 postos de colheita para os testes de diagnóstico do SARS-CoV-2.

O CMLGS em Viseu é um laboratório regional, desse modo, amostras com requisição de parâmetros analíticos menos usuais na prática clínica, ou cuja análise requer metodologias mais complexas, são enviadas para os laboratórios centrais do Grupo Germano de Sousa.

O fluxo das amostras nas várias fases encontra esquematizado na **Figura I**.

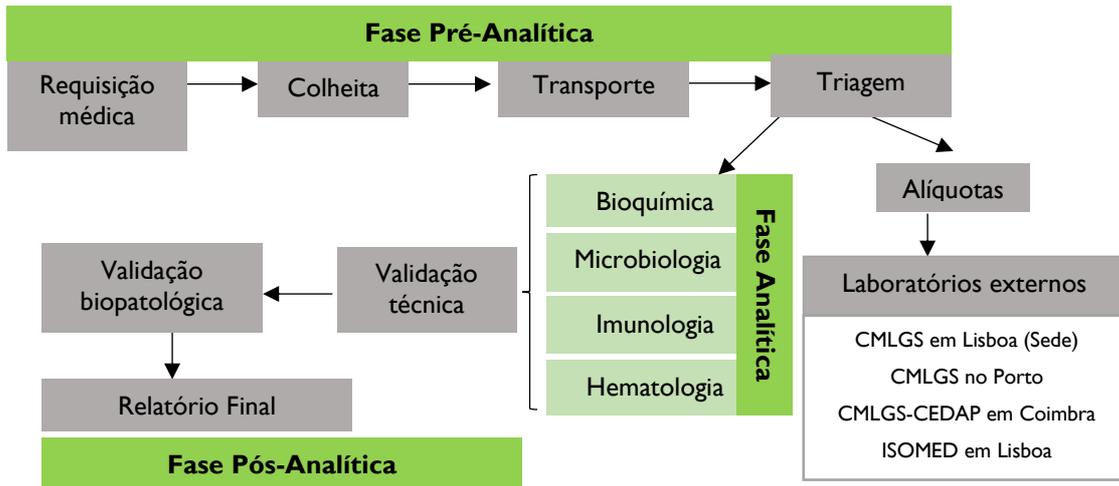


Figura 1: Fluxograma das amostras no CMLGS em Viseu.

### 2.3.1. Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica constitui uma etapa fundamental, que inclui a colheita da amostra, o transporte adequado e a preparação das amostras para a fase analítica [8]. Nesta fase do processo analítico é essencial adotar o máximo de rigor ao longo de todos os procedimentos, pois é nesta fase que se concentra o maior número de erros laboratoriais [9].

Numa primeira abordagem ao laboratório é importante orientar o utente sobre a preparação a efetuar antes da colheita, com base nos parâmetros analíticos da requisição médica. No dia da colheita é realizada a verificação dos dados pessoais do utente, dos parâmetros a analisar e a eventual recolha de informações relevantes na interpretação dos resultados laboratoriais.

A colheita é realizada, com base no Manual de Boas Práticas Laboratoriais e de acordo com os requisitos constatados no Manual de Colheitas, por enfermeiros e TSdT.

A identificação dos produtos biológicos é efetuada na presença do utente sendo que, para cada amostra, é atribuído um código alfanumérico (Figura 2) que permite a identificação das várias amostras do utente. Para além disso, este código permite a comunicação do sistema com os equipamentos, para analisar somente os parâmetros requisitados.

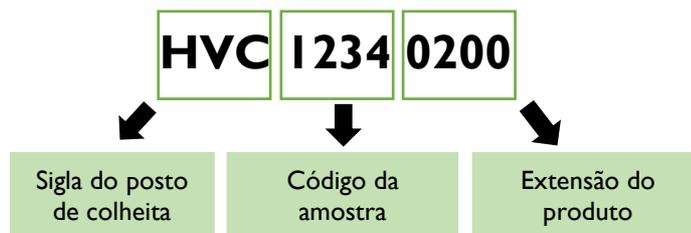


Figura 2: Código alfanumérico atribuído às amostras no CMLGS-Viseu.

Os produtos biológicos colhidos são transportados, devidamente acondicionados, dos postos de colheita para o laboratório, pelos estafetas com a maior brevidade possível.

No laboratório as amostras são triadas na sala de triagem, esta etapa é fundamental para simplificar o processo analítico e minimizar erros. A primeira abordagem da triagem consiste na verificação da conformidade da amostra. Caso esta não se verifique, a amostra é rejeitada para os produtos não conformes e solicita-se a realização de uma nova colheita.

Os produtos biológicos a analisar nos laboratórios centrais do grupo Germano de Sousa são divididos em alíquotas, que são enviadas diariamente pelos estafetas. Cada amostra enviada possui duas alíquotas, uma das quais permanece no laboratório, armazenada durante um período de tempo determinado e controlado pelo sistema informático.

As amostras de carácter urgente do Hospital CUF são entregues na receção do laboratório à equipa técnica. Estas amostras são processadas, segundo níveis de serviço acordados com o grupo José Mello Saúde, que determinam os tempos de resposta (TAT) a cumprir para cada parâmetro analítico. Os equipamentos possuem um espaço próprio para receber estas amostras, de modo a priorizar e a garantir um resultado ao clínico no menor tempo possível e em cumprimento com o nível de serviço acordado.

### **2.3.2. Fase Analítica**

Após a triagem, as amostras são direcionadas para cada área analítica, de modo a serem processadas consoante os parâmetros laboratoriais requeridos. Os equipamentos disponíveis no laboratório (**Tabela I**) encontram-se divididos por áreas analíticas a fim de facilitar o processamento das amostras.

No início do dia de trabalho, os equipamentos são sujeitos a manutenções e controlos internos, para estarem aptos a receber as amostras de ambulatório. Estes procedimentos encontram-se previamente estabelecidos num mapa afixado para facilitar a rotina diária dos técnicos. Todo o processo analítico é desempenhado pela equipa técnica, com supervisão técnica do diretor clínico.

O cruzamento de dados do doente com os dados do equipamento é realizado através do sistema informático do laboratório, o *Apollo*. Este permite integrar todos os dados do utente, o histórico analítico e o historial clínico, quando descrito, e faz a comunicação com os equipamentos, permitindo a sua análise e posterior validação.

**Tabela I:** Distribuição dos equipamentos nas diferentes áreas analíticas no CMLGS em Viseu.

	<b>Equipamentos</b>	<b>Determinação</b>
<b>Bioquímica</b>	Dimension® RXL, Siemens Dimension® RXL RMS, Siemens	Analisador de parâmetros bioquímicos
	Minicap, Sebia	Eletroforese das proteínas séricas
	EPOC®, Siemens	Gasimetria de sangue arterial
<b>Imunologia</b>	ADVIA Centaur® XP, Siemens	Analisador de biomarcadores tumorais, hormonas e doenças infecciosas
	VIDAS®, bioMérieux	Analisador de biomarcadores cardíacos e de infeção, hormonas e proteínas
<b>Hematologia</b>	XT-4000i™, Sysmex XT-1800i™, Sysmex	Hemograma e contagem de reticulócitos
	Ves-Matic Cube 30, A. Menarini diagnostics	Velocidade de sedimentação
	CA-500, Sysmex	Hemóstase e coagulação
	HB9210 PREMIER, A. Menarini diagnostics	Hemoglobina glicada
	Motic® BA310 Series	Microscopia ótica
<b>Microbiologia</b>	BACTEC™ 9050™, BD	Deteção de crescimento microbiano em hemoculturas
	VITEK® 2 Compact, bioMérieux	Identificação bacteriana e teste de sensibilidade antimicrobiana
	GeneXpert® System, Cepheid	Deteção de SARS-CoV-2
	Aura-mini, BioAir	Câmara de fluxo laminar
	Aution Max™ AX-4280, ARKRAY Aution JET™ AJ-4270, ARKRAY	Análise sumária da urina

### 2.3.3. Fase Pós-Analítica

Após a análise dos diversos parâmetros é efetuada uma validação técnica para verificar se os valores obtidos são corretos ou ocasionados devido a alguma anomalia ou discrepância do equipamento, nesse caso a amostra é novamente analisada. Esta primeira abordagem é realizada pelos técnicos e de seguida é feita a validação biopatológica pelo responsável técnico dos vários setores, o diretor clínico, que com base no historial clínico do doente, interpreta os resultados laboratoriais obtidos, de modo a perceber se estão de acordo com os dados clínicos e finalmente procede-se à emissão do relatório analítico.

As amostras são armazenadas após a sua análise em arcas frigoríficas com a temperatura adequada à sua preservação, onde permanecem durante o período de tempo que se encontra estabelecido no sistema informático. A eliminação dos produtos biológicos é

realizada semanalmente em dias específicos, com base nos dados do sistema informático. Estes resíduos são recolhidos e devidamente tratados por uma empresa externa.

## **2.4. Controlo de Qualidade**

Os laboratórios de Análises Clínicas devem priorizar a qualidade dos seus resultados com o objetivo primordial de fornecer ao clínico e ao doente resultados cada vez mais precisos e exatos [10].

O grupo Germano de Sousa prioriza o rigor e a qualidade dos resultados laboratoriais que faculta aos seus doentes/clientes. Nesta direção, é com essa máxima que o grupo adotou um Sistema de Gestão de Qualidade certificado pela Norma ISO 9001:2015, que através de um conjunto de normas permite um melhor desempenho de uma forma mais eficaz e eficiente [11]. O CMLGS em Viseu aplica, nas várias áreas analíticas, controlos de qualidade internos (CQI) diariamente e participa em programas de avaliação externa da qualidade (AEQ).

### **2.4.1. Controlo de Qualidade Interno**

O controlo de qualidade interno (CQI) é indispensável no procedimento analítico uma vez que, permite avaliar o desempenho do equipamento, verificar possíveis erros sistemáticos ou aleatórios e melhorar a precisão dos resultados laboratoriais.

Este processo é realizado através de *kits* de controlo fornecidos pelas casas comerciais, que consistem em preparações com a concentração conhecida do analito e que geralmente possuem vários níveis de concentração (baixo, normal e alto).

As cartas de *Levey-Jennings* permitem a visualização gráfica ao longo do tempo dos resultados obtidos do controlo interno. Estas cartas possuem limites definidos pelos valores de média e desvio padrão (obtidos a partir de operações estáveis) que são fornecidos pela casa comercial do equipamento [12]. A avaliação destas cartas controlo é realizada com base nas regras de *Westgard* e pelos critérios estabelecidos previamente pelo diretor clínico. Isto, permite verificar se o valor analítico do controlo está dentro ou fora do intervalo definido. Este procedimento é realizado pelos TSDT e avaliado mensalmente pelo responsável de qualidade, o diretor clínico. A frequência dos controlos internos é realizada com base no trabalho diário do equipamento.

Os equipamentos são sujeitos a calibrações periódicas e sempre que há uma mudança de lote num determinado reagente.

### 2.4.2. Avaliação Externa da Qualidade

A participação do laboratório em programas de avaliação externa da qualidade (AEQ) é fundamental pois, através da comparação com os vários laboratórios, permite uma maior harmonização nos resultados e uma melhoria contínua, visto que, os resultados são também comparados com parâmetros de qualidade já estabelecidos, promovendo um sistema de gestão de qualidade dinâmico [10].

O Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa participa em programas de avaliação externa da qualidade o SECQ (*Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*), UK-NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*) e o PNAEQ (Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade) do Instituto Nacional Ricardo Jorge.

## 3. Imunologia

---

O sector da Imunologia é uma área laboratorial em que as várias técnicas têm por base a ligação antígeno-anticorpo, para quantificar ou qualificar diversos analitos.

Durante o estágio foi possível participar nas manutenções dos equipamentos, na realização dos controlos internos diários, na execução de técnicas manuais e também na observação da validação analítica.

A amostra mais utilizada neste setor é o soro, colhido num tubo com ativador de coágulo e gel de separação. Após a colheita, aguarda-se a formação do coágulo. Posteriormente, o tubo é centrifugado a uma rotação de 3000 rpm durante 10 minutos. Em alguns ensaios, é utilizado o plasma, como é o caso da análise dos D-dímeros.

No CMLGS em Viseu, este setor é maioritariamente automatizado, constituído por dois equipamentos (**Tabela II**), localizados na sala polivalente. Devido ao elevado fluxo de amostras, estes equipamentos são sujeitos a controlos internos diários, a pelos menos dois níveis distintos.

O ADVIA Centaur<sup>®</sup> XP da Siemens é um analisador que através da quimioluminescência combinada com a tecnologia de imunoensaio permite quantificar o analito presente na amostra através da luz produzida na reação.

O VIDAS<sup>®</sup> da bioMérieux tem por base o princípio ELFA que realiza testes imunoenzimáticos com leitura por fluorescência. Este aparelho é utilizado, principalmente, para parâmetros de carácter urgente, como é o caso dos biomarcadores de lesão cardíaca. Para além destes analitos, realiza a análise do D-dímero, um biomarcador importante para perceber possíveis alterações da hemóstase, nomeadamente trombozes intravasculares [13] e ainda a Procalcitonina, um biomarcador importante na sépsis [14].

Somado a estes equipamentos, existem algumas técnicas manuais (**Tabela III**) no laboratório que permitem uma avaliação qualitativa de inúmeras doenças infecciosas.

**Tabela II:** Parâmetros analisados nas técnicas automatizadas de Imunologia e a respectiva metodologia.

Equipamento	Metodologia		Parâmetro analítico
ADVIA Centaur® XP, Siemens	Quimioluminescência	Imunoensaio Sanduíche	Anti-HCV, CA125, CEA, HIV (Ag. p24 + anti-HIV1/2), Ferritina, fPSA, FSH, Ag. Hbs, PSA
		Imunoensaio competitivo	T3, T4, VB12
		Imunoensaio de captura de anticorpo	Anti-Hbs, TSH
VIDAS®, bioMérieux	Fluoroenzimático	Imunoensaio Sanduíche	β-HCG, CK-MB, D-dímeros, Mioglobina, NT-proBNP, Procalcitonina, hs-cTnI
		Imunoensaio competitivo	Digoxina

**Tabela III:** Técnicas serológicas manuais disponíveis no laboratório para a avaliação de doenças infecciosas.

Metodologia	Kits comerciais	Diagnóstico
Reação de Paul-Bunnell	Mononucleosi Latex, Mascia Brunelli	Mononucleose infecciosa (vírus Epstein-Barr)
Reação de Rosa Bengala	Brucelloslide-Test, bioMérieux	Brucelose ( <i>Brucella</i> )
Reação de Weil-Felix	MICROPATH® Proteus OX2, Omega Diagnostics	Infeções por <i>Rickettsia</i>
Reação de Widal	MICROPATH®, Omega Diagnostics	Infeções por <i>Salmonella</i>
VDRL	Syphilis RPR Test, Human Diagnostics	Diagnóstico não treponémico da sífilis
TPHA	TPHA, Cypress Diagnostics	Diagnóstico treponémico da sífilis

## 4. Bioquímica

A Bioquímica é a área laboratorial com um maior fluxo de amostras, por isso é essencialmente automatizada, para evitar erros que possam comprometer os resultados. Analisa uma vasta gama de parâmetros laboratoriais que permitem a avaliação da função hepática, renal, cardíaca, do metabolismo mineral, de inflamações e o estudo de parâmetros que auxiliam no diagnóstico da anemia.

As amostras mais frequentes para análise são o soro e a urina. Além destas amostras, durante o tempo de estágio, foi possível ter contato com amostras do âmbito hospitalar, como é o caso do líquido sinovial, líquido cefalorraquidiano (LCR) e líquido pleural.

Os equipamentos da Bioquímica (**Tabela IV**) localizam-se na sala polivalente. Os analisadores Dimension® RXL e Dimension® RXL RMS da Siemens, possuem diversas

metodologias bioquímicas e de imunoensaio que permitem a análise de diversos parâmetros assim como, determinam através de cálculo com fórmulas teóricas, parâmetros como a capacidade total de fixação do ferro, a taxa de filtração glomerular e o colesterol LDL.

O laboratório dispõe, na sala de serologia o Minicap da Sebia que através da metodologia de eletroforese capilar permite determinar a eletroforese das proteínas totais em soro, útil para o diagnóstico de diversas patologias, como é o caso do mieloma múltiplo.

Neste setor são ainda realizados um conjunto de métodos imunocromatográficos que permitem a pesquisa de fármacos e substâncias ilícitas na urina como os opiáceos, os canabinóides e a cocaína. Também é comum ocorrerem pedidos para a detecção de  $\beta$ -HCG na urina, por esta metodologia.

Durante o estágio foi possível efetuar o controlo interno diário dos equipamentos, participar nas manutenções semanais e mensais, como também introduzir as amostras nos equipamentos e observar a validação técnica dos parâmetros.

Para além disso, foi possível observar a realização de gasimetrias de sangue arterial, que são uma análise frequente no Hospital CUF a nível do bloco operatório e internamento pois, é uma análise que fornece informações sobre o equilíbrio eletrolítico e ácido-base do doente.

**Tabela IV:** Equipamentos de Bioquímica e a metodologia utilizada para a determinação dos vários analitos.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros
<b>Dimension® RXL, Siemens</b> <b>Dimension® RXL RMS, Siemens</b>	Potenciometria com elétrodos seletivos de iões	Sódio, Potássio, Cloreto
	Ensaio de cor enzimático	Triglicérides, Colesterol HDL, Colesterol Total, Ácido Úrico
	Ensaio UV enzimático	Glicose
	Ensaio UV cinético	Creatina Cinase, Lactato desidrogenase, Aspartato aminotransferase, Alanina aminotransferase, Ureia
	Ensaio de cor cinético	Gama-Glutamiltransferase, Fosfatase alcalina, Amilase, Creatinina
	Ensaio de cor fotométrico	Ferro, Albumina, Proteínas totais séricas e Proteínas totais urinárias, Cálcio, Magnésio, Bilirrubina direta, Bilirrubina total
	Imunoensaio turbidimétrico	Ferritina, Proteína C Reativa, Microalbuminúria, fator reumatoide, Anti-estreptolisina O
	Ensaio UV fotométrico	Fosfato
<b>Minicap, Sebia</b>	Eletroforese Capilar	Eletroforese das proteínas séricas
<b>EPOC®, Siemens</b>	Potenciometria	pH, pCO <sub>2</sub> , Sódio, Potássio, Cálcio ionizado, Cloreto, Nitrogénio Ureico, TCO <sub>2</sub> *
	Condutimetria	Hematócrito
	Amperometria	pO <sub>2</sub> , Glucose, Lactato, Creatinina

\* parâmetros calculados através de fórmulas teóricas

## 5. Microbiologia

---

A Microbiologia estuda os diversos microrganismos e a sua interação com o ambiente e com os restantes seres vivos [15]. O ser humano é densamente colonizado por microrganismos que estabelecem relações de simbiose e de comensalismo. Essa comunidade denominada microbioma, é importante para diversos aspetos fisiológicos do hospedeiro, nomeadamente a nível imunológico e metabólico [16,17].

Contudo, nem todos os microrganismos estabelecem relações benéficas com o indivíduo, podendo em determinadas circunstâncias proliferar e estabelecer uma infeção [18]. Dessa forma, é imprescindível a aplicação da Microbiologia na área clínica para o diagnóstico e monitorização de doenças infecciosas causadas por múltiplos agentes como vírus, parasitas, fungos e bactérias [19]. O diagnóstico laboratorial em Microbiologia tem por base o exame microscópico, o exame cultural, as provas complementares de diagnóstico, os testes imunocromatográficos, a identificação do microrganismo e os testes de suscetibilidade.

No CMLGS em Viseu esta área laboratorial encontra-se numa sala isolada dos restantes setores e dispõe de uma câmara de fluxo laminar, uma estufa, um microscópio ótico, duas arcas frigoríficas e equipamentos automatizados, o VITEK® 2 COMPACT, o BACTEC™ 9050™, GeneXpert® e o Aution Max™, apesar destes últimos por uma questão de logística, não se encontrarem nesta sala. O laboratório concentra o seu diagnóstico a nível bacteriológico e parasitológico por isso, estas duas áreas, são descritas em mais detalhe neste relatório.

Na triagem dos produtos biológicos para a Microbiologia é realizada uma avaliação da qualidade da amostra, no sentido de perceber se a colheita e o transporte foram os mais adequados, para viabilizar os potenciais microrganismos existentes e evitar contaminações. Se não reunir estes parâmetros a amostra é rejeitada e solicita-se a repetição de colheita.

A passagem pelo setor da Microbiologia permitiu consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do mestrado. Durante este período foi possível participar em toda a rotina laboratorial, desde a preparação das amostras biológicas para inocular em meios de cultura, preparação das amostras para a identificação bacteriana e testes de suscetibilidade antibacteriana, realização das diferentes colorações, observação em microscópio ótico de várias amostras, a análise e validação com base nos conhecimentos teóricos e ainda a participação no procedimento da avaliação externa da qualidade.

### 5.1. Exame microscópico direto

O exame microscópico direto é uma etapa fundamental no diagnóstico microbiológico. A observação microscópica da amostra permite realizar um diagnóstico presuntivo dos microrganismos e direcionar as próximas etapas de identificação. O exame microscópico direto permite a visualização de bactérias, fungos, parasitas, estruturas celulares e leucócitos [20].

Este pode ser realizado a fresco, útil para a observação de parasitas, ou após a realização de um esfregaço (**Anexo I**), com as várias colorações. O laboratório utiliza a coloração de Gram (**Anexo III**), a coloração de Ziehl-Neelsen (**Anexo IV**) e a coloração de Wright (**Anexo V**).

Na maioria das amostras é realizada a coloração de Gram, esta é importante para avaliar a morfologia bacteriana e distinguir as bactérias Gram negativas e Gram positivas que, devido às suas diferenças estruturais na parede celular e de permeabilidade, ficam coradas com cores diferentes. Esta observação pode ser importante para o diagnóstico presuntivo de microrganismos patogênicos fastidiosos de difícil crescimento ou de crescimento lento e permite avaliar a qualidade da amostra [21].

No caso das expetorações e outras secreções é efetuada a coloração de Ziehl-Neelsen que permite corar bactérias ácido-álcool-resistentes como é o caso das micobactérias, nomeadamente a *Mycobacterium tuberculosis* [22].

A coloração de Wright é útil para a deteção de parasitas e corpos de inclusões de clamídia, visualização de leucócitos polimorfonucleares, mononucleares e células, assim como, organismos intracelulares [20].

### 5.2. Exame cultural

Após a realização do exame microscópico, procede-se ao exame cultural, com base na informação obtida pelo exame direto e com as *guidelines* que o laboratório possui para cada tipo de amostra. Este é fundamental para o crescimento e o isolamento do microrganismo.

O laboratório dispõe de meios sólidos e líquidos da casa comercial bioMérieux (**Anexo II**), que possuem diversas aplicações. Os meios de enriquecimento não seletivos permitem o crescimento da maioria dos microrganismos não fastidiosos. Os meios seletivos permitem o isolamento de determinados microrganismos numa amostra polimicrobiana, uma vez que possuem agentes inibidores capazes de inibir o crescimento dos restantes microrganismos. Os meios diferenciais permitem através da adição de substratos a identificação dos microrganismos, pelo aspeto da colónia [20].

Para a incubação das culturas, o laboratório dispõe de duas estufas a 37°C. Para bactérias microaerofílicas e capnofílicas, de modo a proporcionar um ambiente favorável ao seu crescimento, utiliza-se um sistema de incubação em caixas isoladoras, as GENbox (bioMérieux), com geradores o GENbox microaer (bioMérieux) e GENbox CO<sub>2</sub> (bioMérieux).

### 5.3. Provas complementares de diagnóstico

As provas complementares disponíveis no CMLGS em Viseu encontram-se descritas na **Tabela V**. Estes testes são indispensáveis no laboratório, pois fornecem informação útil na identificação de microrganismos e permitem orientar as etapas posteriores do diagnóstico.

**Tabela V:** Provas complementares de diagnóstico disponíveis no CMLGS em Viseu.

Fundamento teórico	Metodologia	Diagnóstico
<b>Prova da Oxidase</b>		
Citocromo oxidase é uma enzima terminal da cadeia respiratória que catalisa a oxidação do citocromo c através da transferência de eletrões e reduz o oxigénio molecular, formando água [23].	Adicionar a colónia isolada no papel de filtro com reagente, o dihidroclorato de tetrametil-p-fenilenodiamina (dador artificial de eletrões para o citocromo c) [24]. Observar a alteração de cor.	<b>Oxidase Negativa</b> (Incolor) <i>Enterobacteriaceae</i>  <b>Oxidase Positiva</b> (Azul-escuro) <i>Pseudomonas, Neisseria, Campylobacter</i>
<b>Prova da Catalase</b>		
Catalase é uma enzima que catalisa a quebra do peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), em água (H <sub>2</sub> O) e oxigénio (O <sub>2</sub> ) [25].	Adicionar a uma lâmina com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uma colónia isolada do meio e observar as alterações.	<b>Catalase Negativa</b> (Sem reação) <i>Streptococcus</i>  <b>Catalase Positiva</b> (Libertação de bolhas) <i>Staphylococcus</i>
<b>Prova da Coagulação</b>		
A prova da Coagulase é realizada com o Pastorex™ Staph-plus kit (BIO-RAD). Este teste de aglutinação é constituído por látex sensibilizado por fibrinogénio e IgG para determinar os fatores de afinidade ao fibrinogénio e à proteína A característicos de <i>S. aureus</i> [26].	Colocar uma gota do reagente previamente homogeneizado na placa de aglutinação. Retirar uma colónia pura do meio com a ansa e colocar na placa de aglutinação, realizando uma homogeneização em movimentos circulares. Observar alterações.	<b>Coagulase Positiva</b> (Agregados visíveis a olho nu) <i>Staphylococcus aureus</i>  <b>Coagulase Negativa</b> (Sem formação de agregados)

**Tabela V (Continuação):** Provas complementares de diagnóstico disponíveis no CMLGS em Viseu.

Fundamento teórico	Metodologia	Diagnóstico
<b>Prova da filamentação</b>		
<i>Candida albicans</i> é uma levedura que apresenta dimorfismo, forma leveduriforme ou forma filamentosa consoante as condições de crescimento [27].	Inocular uma colónia pura de levedura em 0,5 mL de soro fresco humano, com uma incubação a 37°C durante 2h30. Visualizar o tubo germinativo no ponto de origem na célula mãe [27].	<b>Positivo</b> (tubo germinativo sem constrição) <i>Candida albicans</i>  <b>Negativo</b> (tubo germinativo com constrição)
<b>Prova de suscetibilidade à Optoquina</b>		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> é sensível ao antibiótico Optoquina [28].	Inocular a amostra em meio de cultura com disco de difusão de Optoquina em meio de cultura. Medir o halo de inibição.	<b>Positivo</b> (halo de inibição é $\geq 19$ mm) [28] <i>Streptococcus pneumoniae</i>

#### 5.4. Técnicas imunológicas

As técnicas imunológicas são aplicadas na Microbiologia para detetar, identificar e quantificar antigénios dos agentes patogénicos, bem como avaliar a presença de anticorpos desencadeados pela resposta do organismo à infeção, perante a exposição a um microrganismo. Desse modo, estas técnicas tornaram-se imprescindíveis no laboratório, pois permite de forma simples e rápida a deteção de inúmeros microrganismos [29]. Em ambiente hospitalar é particularmente importante este tempo de resposta, pois permite direccionar o tratamento das doenças infecciosas e providenciar um bom prognóstico.

No CMLGS em Viseu as técnicas imunocromatográficas são utilizadas em diversas amostras clínicas para deteção qualitativa de diversos microrganismos como bactérias, vírus (Tabela VI).

**Tabela VI:** Testes imunocromatográficos disponíveis no CMLGS em Viseu para o diagnóstico de microrganismos.

Kit	Deteção	Patologia
<b>Urina</b>		
BinaxNOW™ <i>Legionella</i> Urinary Antigen Test	Antigénios dos lipopolissacarídeos presentes em <i>Legionella pneumophila</i> do serogrupo I [30].	Infeções do trato respiratório através da inalação de aerossóis [31].
BinaxNOW™ <i>Streptococcus pneumoniae</i> Antigen Card	Antigénio polissacarídeo C de <i>Streptococcus pneumoniae</i> [32].	Agente etiológico mais frequente em pneumonias adquiridas na comunidade [33].
<b>Fezes</b>		
TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®	Toxinas A e B produzidas pelo <i>Clostridium Difficile</i> e do antigénio	Diarreia aquosa ou colite pseudomembranosa e o megacólon tóxico [34].

**Tabela VI (Continuação):** Testes imunocromatográficos disponíveis no CMLGS em Viseu para o diagnóstico de microrganismos.

	glutamato desidrogenase (GDH) [34].	
CerTest Biotech Rotavírus + Adenovírus	Deteção de antígeno de Adenovírus e Rotavírus.	Responsáveis pela maioria das gastroenterites de crianças com idade inferior a 5 anos. A patogénese dos dois vírus é semelhante [35].
bioNexia® FOBplus	Deteção de hemoglobina.	Recomendado principalmente em idosos, pois permite a deteção de tumores colorretais subclínicos [36].
<b>Exsudado Faríngeo</b>		
BIOSYNEX® STREP A	Deteção de antígeno de <i>Streptococcus</i> β-hemolítico do grupo A.	Causa frequente de faringite com origem bacteriana [37].
<b>Exsudado nasofaríngeo</b>		
CLINITEST® Rapid COVID-19 Antigen Test	Deteção da proteína da nucleocápside do SARS CoV-2.	Vírus pandémico responsável pela doença COVID 19.
<b>Sangue</b>		
VIKIA® Malaria Ag Pf/Pan	Deteção de antígenos de <i>Plasmodium falciparum</i> e outras espécies.	<i>P. falciparum</i> é a causa da maioria das mortes de malária [38].

## 5.5. Identificação microbiana e testes de suscetibilidade antibacteriana

### 5.5.1. VITEK® 2 COMPACT

Para um diagnóstico definitivo é necessário realizar a identificação microbiana e os testes de sensibilidade antibacteriana com base na informação obtida anteriormente pelo exame direto, cultural e as provas complementares. O laboratório utiliza um sistema automatizado, o VITEK® 2 COMPACT, que permite a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana e a identificação de microrganismos com base no seu perfil bioquímico e metabólico.

A identificação dos microrganismos é realizada através de cartas, que reúnem um conjunto de substratos, individualizados por poços que, permitem avaliar a fonte de carbono utilizada pelo microrganismo, assim como a sua atividade enzimática [39].

O teste de sensibilidade antibacteriana é igualmente realizado através de cartas, em que cada poço possui uma concentração conhecida de antibiótico, e cada carta reúne um conjunto de antibióticos adequados para determinado tipo de microrganismo. Esta metodologia permite a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) aos antibióticos testados [41,42]. As cartas disponíveis no laboratório encontram-se descritas na

#### **Tabela VII.**

Para a realização desta técnica é necessária uma suspensão bacteriana. Esta suspensão é realizada através da inoculação da bactéria pura em 2,5 mL de uma solução de cloreto de

sódio a 0,45%, ajustada a uma determinada densidade da escala McFarland, medida através de um densitómetro, o DensiCHEK Plus (bioMérieux) [40].

A leitura das cartas de identificação microbiana é realizada por fluorescência e a leitura dos testes de suscetibilidade antibacteriana por turbidimetria [42,43]. Os microrganismos são classificados como resistentes, intermédios e sensíveis segundo as normas de EUCAST, com base nas CMI's obtidas nas cartas.

**Tabela VII:** Cartas disponíveis para o equipamento VITEK® 2 COMPACT para a identificação bacteriana e os testes de suscetibilidade antibacteriana no CMLGS em Viseu.

Identificação Microbiana		
Cartas	Densidade McFarland	Aplicação
GP	0,50-0,63	Identificação de bactérias Gram Positivas
GN	0,50-0,63	Identificação de bactérias Gram Negativas
Testes de Suscetibilidade antibacteriana		
Cartas	Densidade McFarland	Aplicação
AST-ST03	0,50-0,63	<i>Streptococcus spp.</i>
AST-P648	0,50-0,63	<i>Staphylococcus spp.</i>
AST-P586	0,50-0,63	<i>Staphylococcus spp.</i> e <i>Enterococcus spp.</i>
AST-N355	0,50-0,63	Bacilos Gram negativos fermentadores (uso hospitalar)
AST-N359	0,50-0,63	Bacilos Gram negativos fermentadores
AST-N373	0,50-0,63	Bacilos Gram negativos não fermentadores

## 5.6. Produtos biológicos para análise microbiológica

### 5.6.1. Amostras do trato urinário

O trato urinário possui um ambiente estéril, embora em literatura mais recente haver a evidência de uma possível microbiota associada [44,45]. Contudo, a proliferação e a colonização por determinadas bactérias ao longo do trato urinário, podem desencadear uma potencial infeção [45].

As infeções do trato urinário (ITU) são mais frequentes em mulheres devido á sua anatomia. Estas infeções podem afetar o trato urinário inferior (cistite) ou em situações mais graves o trato urinário superior (pielonefrite) [46].

O diagnóstico das infeções urinárias deve ter em consideração a sintomatologia, os resultados da urocultura e do sedimento urinário [46,47].

**Agentes patogénicos mais comuns:** *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*), *Enterococci spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Candida spp.* [46].

### 5.6.1.1. Urina

As infeções do trato urinário são as infeções bacterianas mais comuns, sendo a urina um dos produtos biológicos mais frequentes para a análise microbiológica [47].

A colheita mais usual é do jato intermédio, em que o doente deve colher a primeira urina da manhã. O indivíduo deve realizar a higienização da zona genital e recolher em frasco estéril o jato intermédio, desperdiçando o primeiro jato de urina, de modo a evitar a contaminação da microbiota da uretra. No caso das crianças, é frequente a colheita em saco coletor. Neste caso, o procedimento inicia-se com a higienização da área genital com água e sabão e posteriormente a colocação do saco coletor, este é enviado para o laboratório [28].

As amostras de urina após a triagem seguem diferentes percursos. O frasco onde foi realizada a colheita, é direcionado para a sala de Microbiologia onde irá ser semeado para obtenção de urocultura. Do frasco, é retirado urina para um tubo compatível com o aparelho que vai realizar a análise da urina tipo II, sendo este posteriormente centrifugado e o sedimento urinário visualizado no microscópio.

#### 5.6.1.1.1 Urina tipo II

A urina tipo II ou sumária da urina é uma análise laboratorial que avalia a função renal e urológica [48]. A análise de amostras de ambulatório é realizada pelo Aution Max™ AX-4280 (ARKRAY), sendo as amostras urgentes analisadas pelo aparelho Aution JET™ AJ-4270 (ARKRAY). Ambos os aparelhos possuem a mesma metodologia, que consiste em realizar a leitura através de refletância, permitindo averiguar as alterações das várias reações químicas das tiras teste, as Uriflet S (ARKRAY). Estas permitem a análise de diversos parâmetros através de reagentes impregnados nas tiras: glucose, nitritos, leucócitos, eritrócitos, pH, bilirrubina, proteína, cetonas e urobilinogénio.

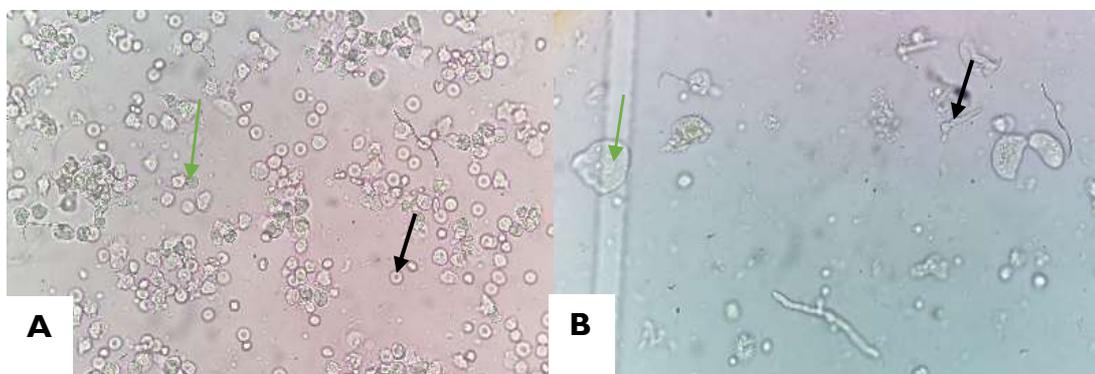
#### 5.6.1.1.2 Sedimento urinário

Após a análise sumária da urina é fundamental realizar a observação microscópica do sedimento urinário, para perceber se os resultados da sumária da urina são concordantes com a situação clínica do doente. Desse modo, o CMLGS em Viseu realiza na sua rotina laboratorial

o sedimento urinário de todas as urinas em que é requisitado a sumária de urina, para uma melhor avaliação da urina do doente.

Para a obtenção do sedimento urinário, o tubo que foi utilizado para a análise da urina tipo II é centrifugado (1500 rpm; 5 min), o que permite a concentração no sedimento dos componentes não solúveis da urina, para serem observados no microscópio. A análise é realizada num microscópio ótico com uma ampliação de 40x [49]. Na observação microscópica é possível visualizar leucócitos, eritrócitos, elementos leveduriformes, bactérias, cilindros, fosfatos, oxalatos, cristais de ácido úrico e de fármacos (**Figura 3**).

Durante a observação microscópica é realizada uma contagem de cada uma das estruturas em 5 campos com uma câmara de *Neubauer* e a contagem final é dada por campo, esta informação é essencial para a interpretação das uroculturas.



**Figura 3:** Observação ao microscópio ótico de sedimento urinário com a ampliação de 40x. **A-** Urina com a presença de eritrócitos (seta preta) e leucócitos (seta verde). **B-** Urina com a presença de leveduras com pseudofilamentos (seta preta) e células epiteliais (seta verde) (Fotografado em CMLGS-Viseu).

### 5.6.1.1.3 Urocultura

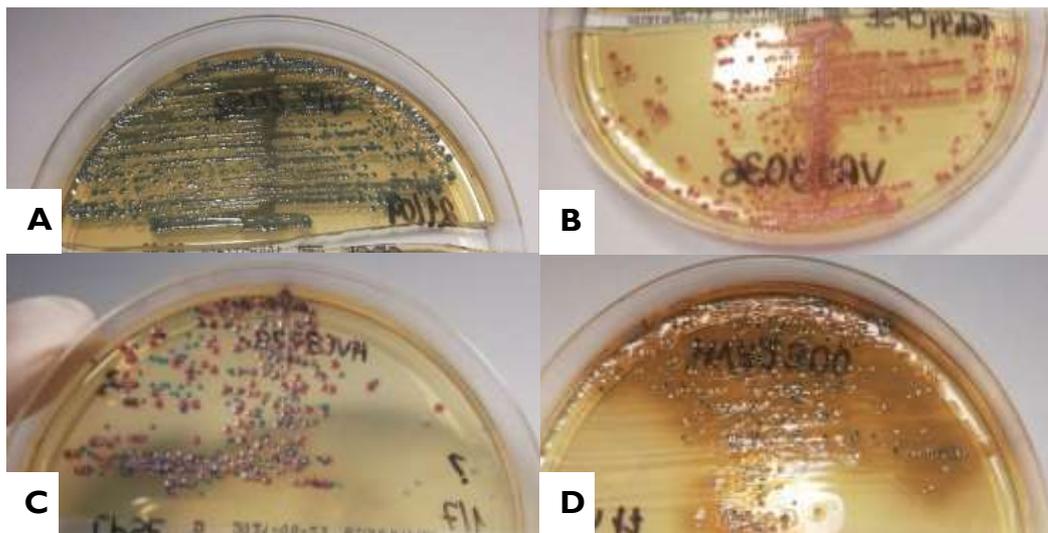
A urina previamente homogeneizada é semeada em placa de meio ChromID CPS Elite (CPSE) e incubada por um período de 18/24 horas a 37°C na estufa. Posteriormente, é realizada a observação das colónias.

O meio CPSE é um meio cromogénico que, através da utilização de substratos enzimáticos impregnados no ágar, permite a diferenciação das colónias com base na sua atividade enzimática [50]. Isto possibilita o isolamento e a identificação presuntiva das bactérias responsáveis pela maioria das infeções urinárias, através das características da colónia (**Figura 4**), agilizando o procedimento laboratorial, ao reduzir o tempo de resposta ao clínico e os custos associados [51].

Após a análise das culturas realiza-se uma interpretação dos resultados em que são considerados diversas variáveis tais como: a contagem das colónias obtidas, a pureza da cultura, a contagem de leucócitos no sedimento urinário e a presença ou ausência de sintomas. Uma urocultura é considerada positiva quando apresenta uma contagem de colónias  $\geq 10^5$

UFC/mL, com a presença de leucócitos e com sintomas associados. As culturas puras com contagem  $\geq 10^5$  UFC/mL, com ausência de leucócitos, mas com sintomatologia também são consideradas positivas [46].

O exame cultural com mais que um tipo de colônias e um sedimento urinário com elevada contagem de células epiteliais considera-se urocultura negativa pois, é provável tratar-se de contaminação. As culturas sem crescimento são negativas e é emitido o resultado. As culturas positivas são sujeitas a provas complementares de diagnóstico para a posterior identificação bacteriana e testes de suscetibilidade antibacteriana.



**Figura 4:** Colônias com diferentes morfologias no meio ChromID CPS Elite. **A-** Cultura pura presuntiva de *Klebsiella* spp., com contagem superior a  $10^5$  UFC/mL. **B-** Cultura pura presuntiva de *Escherichia coli*, com contagem superior a  $10^5$  UFC/mL. **C-** Cultura polimicrobiana não valorizada. **D-** Cultura presuntiva de *Proteus* spp. (Colônias Laranja) com contaminação, possivelmente de *Enterococcus* (Fotografado em CMLGS-Visau).

### 5.6.2. Amostras do trato gastrointestinal

Entre os diversos distúrbios gastrointestinais, a diarreia aguda é um dos problemas mais comuns. Os episódios de diarreia aguda podem ter uma etiologia infecciosa associada, provocada por agentes patogénicos (vírus, bactérias, parasitas) ou uma etiologia não infecciosa, desencadeada pelo uso de laxantes ou por patologias como tumores, má absorção intestinal, doença inflamatória do intestino, síndrome do intestino irritável, entre outros [35].

A maioria das diarreias com etiologia infecciosa, são adquiridas pela ingestão de alimentos contaminados. Embora a maioria dos episódios de diarreia em indivíduos saudáveis seja autolimitada, existem fatores que podem desencadear uma sintomatologia mais grave [35].

O quadro clínico das infeções no trato gastrointestinal depende do número de microrganismos ingeridos, do sistema imunitário do hospedeiro, da existência de problemas a nível gástrico e da administração de antibióticos que fragilizam a microbiota do intestino [35].

Para o diagnóstico desta patologia é importante recolher não só o historial clínico, como também a história alimentar, viagens e exame físico de modo a poder direcionar o diagnóstico microbiológico [35].

**Agentes patogénicos mais comuns:** *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp, *Clostridium difficile*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, Adenovírus, Rotavírus [35].

#### 5.6.2.1. Fezes

As amostras de fezes devem ser colhidas numa quantidade de 1 a 2 g, devendo ser obtidas três amostras, em dias não consecutivos. Na colheita é importante escolher uma amostra representativa e que contenha elementos que possam evidenciar uma infeção, tais como muco, pus e sangue [28].

##### 5.6.2.1.1 Coprocultura

As bactérias são uma das principais causas de diarreia aguda, e podem causar infeção através da invasão na mucosa intestinal ou através da produção de toxinas que poderão já estar pré formadas e serem ingeridas ou serem produzidas no intestino [35].

Por norma, o laboratório realiza a pesquisa de bactérias responsáveis pela maioria das infeções gastrointestinais dos países desenvolvidos tais como, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*. As bactérias menos frequentes em países desenvolvidos como *Vibrio*, *Yersinia* e *Listeria*, apenas são pesquisadas em situações específicas, geralmente requeridas pelo clínico sendo que, estas amostras são enviadas para o laboratório central em Lisboa [52].

O procedimento laboratorial inicia-se com a realização de uma suspensão bacteriana, que consiste na homogeneização das amostras de fezes, numa solução salina. Esta suspensão bacteriana é utilizada para a realização do exame cultural e obtenção de dois esfregaços, para a coloração de Gram e de Wright.

As bactérias do género *Salmonella* e *Shigella* fazem parte da família das *Enterobacteriaceae* são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos [53]. Para o isolamento destas bactérias é realizada a inoculação em caldo de Selenito-F-T, um meio de enriquecimento que permite a recuperação e o isolamento destes microrganismos, em amostras com uma microbiota associada. A inoculação é realizada com uma porção de amostra de fezes no caldo e é incubado por 24 horas a 37°C, em aerobiose. Posteriormente, é inoculado em meio Hektoen (HEKT) o conteúdo do caldo de enriquecimento, por 24 horas a 37°C, em aerobiose. As colónias a valorizar neste meio são verdes ou azul esverdeadas, pois a *Salmonella* e a *Shigella*

não fermentam os açúcares disponíveis do meio (não vai ocorrer alteração de cor) e são produtoras de gás de sulfureto de hidrogénio por isso, as colónias com um precipitado preto no centro também são valorizadas [54].

A suspensão bacteriana das fezes é inoculada em MacConkey (MCK), a 37°C por 24 horas, em aerobiose. Este meio permite o isolamento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos [54].

As bactérias do género *Campylobacter* são Gram negativas, móveis, em forma de S e são responsáveis pela maioria das gastroenterites nos países desenvolvidos, principalmente a espécie *Campylobacter jejuni* [55]. Para o isolamento destas bactérias em amostras de fezes é utilizado o meio Campyloset (CAM) um meio seletivo, pois a gelose tem impregnado antibióticos que inibem o crescimento das bactérias da microbiota [54]. Estas bactérias são microaerófilas e por isso, vão ser incubadas em atmosfera adequada (5% O<sub>2</sub>+ 10% CO<sub>2</sub> + 85% N<sub>2</sub>) a 37°C, durante 48 horas. Após este período, as colónias a valorizar são as que apresentam uma prova da oxidase e de catalase positiva.

#### **5.6.2.1.2 Exame parasitológico de fezes**

A incidência de parasitoses intestinais tem diminuído nos países desenvolvidos ao longo dos últimos anos, devido a melhorias no saneamento básico, condições de higiene, mudanças a nível da indústria pecuária e nos métodos para o controlo e deteção destes patógenos. No entanto, nos últimos anos a globalização, as alterações climáticas, a alteração de comportamentos humanos a nível alimentar e de migração possibilitam uma mudança epidemiológica e de transmissão dos parasitas, o que pode resultar num aumento da incidência em países que até então era reduzida [56].

O diagnóstico laboratorial de parasitas consiste, essencialmente, na observação microscópica de estruturas parasitárias (ovos, quistos, trofozoítos, larvas).

O exame parasitológico em fezes no CMLGS em Viseu é realizado em duas etapas: primeiramente realiza-se uma observação macroscópica das amostras de fezes para averiguar a presença de sangue, muco ou estruturas parasitárias visíveis a olho nu; posteriormente as amostras de fezes são sujeitas a um método de concentração por sedimentação - realizado com um kit. Neste método, as amostras de fezes são colocadas inicialmente num tubo cónico que contem formalina a 10% o que permite a preservação das estruturas parasitárias e, em seguida é adicionado 2,5 mL de acetato de etilo no tubo o que vai permitir a separação dos quistos e dos ovos do material fecal [57]. Após este procedimento, o tubo cónico é inserido num tubo com um filtro para separar as partículas de maiores dimensões e a mistura é

centrifugada a 1500 rpm durante 10 min. Para terminar, o sobrenadante é decantado e adiciona-se soluto de Lugol, como corante. A visualização é realizada com uma gota de sedimento entre lâmina e lamela em todos os campos, primeiramente na objetiva de 10x e de seguida com a objetiva de 40x.

### **5.6.3. Amostras do trato genital**

Os exsudados urogenitais permitem a deteção laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e infeções genitais causadas por diversos agentes patogénicos [58].

#### **5.6.3.1. Exsudado vaginal**

O microbioma vaginal desempenha um papel importante na proteção contra a infeção de agentes patogénicos [59]. Este microbioma é desenvolvido logo após o nascimento, através de fontes maternas e ambientais, e vai alterando ao longo do tempo consoante a idade da mulher [60].

A partir da puberdade o estrogénio aumenta de acordo com a fase do ciclo menstrual. Esta hormona promove a deposição de glicogénio no epitélio vaginal que é utilizado no metabolismo anaeróbio de bactérias *Lactobacillus* e convertido em ácido láctico, contribuindo para a manutenção do pH ácido vaginal (<4,5) [61,62]. O pH ácido e a população de *Lactobacillus* impede a colonização por agentes infecciosos e oportunistas na vagina [60, 62].

Uma das causas mais comuns para a análise de exsudado vaginal é a vaginose bacteriana, caracterizada pelo corrimento vaginal sintomático e que poderá estar associada a complicações na saúde reprodutiva [60]. Esta patologia é caracterizada pela predominância de bactérias anaeróbias nomeadamente *Gardnerella vaginalis* na microbiota vaginal e uma diminuição de espécies *Lactobacillus*, que consequentemente leva a uma diminuição dos níveis de ácido láctico, aumentando o pH vaginal [59].

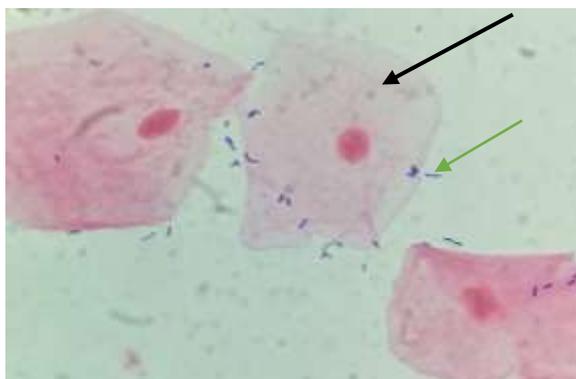
A obtenção do exsudado vaginal é realizada com a introdução de uma zaragatoa humedecida em soro fisiológico estéril no canal vaginal, em que a colheita é realizada nas paredes vaginais. Repete-se o processo com uma segunda zaragatoa. As zaragatoas são transportadas em meios diferentes: uma zaragatoa é transportada em meio de carvão para manter a integridade dos potenciais agentes patogénicos como é o caso de bactérias do género *Neisseria gonorrhoeae* [28] e a outra em soro fisiológico permitindo a realização de esfregaços para o exame microscópico, caso não seja possível a realização do esfregaço no posto de colheita durante a obtenção do exsudado vaginal.

**Agentes infecciosos mais comuns:** *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans* [58].

### 5.6.3.1.1 Exame microscópico

O exame microscópico é realizado primeiramente a fresco, com o conteúdo da zaragatoa diretamente numa lâmina para a visualização da eventual presença de *Trichomonas vaginalis*. Este parasita é um protozoário flagelado do trato genital humano, transmitido por via sexual e é responsável por infeções sintomáticas na mulher que podem desencadear situações de vaginite e cervicite [62].

Posteriormente, é realizada a observação microscópica do esfregaço em coloração de Gram. Nesta análise é importante observar a população de *Lactobacillus* (Figura 5) e outras bactérias predominantes com diferentes morfologias. Em especial, a presença de *Gardnerella vaginalis* que apresenta uma morfologia de cocobacilos, Gram variável e imóvel e *Neisseria gonorrhoeae* que é um diplococo Gram negativo, não móvel e aeróbio [64,65,66].



**Figura 5:** Observação microscópica de esfregaço em coloração de Gram de um exsudado vaginal com uma ampliação de 100x. Exsudado vaginal com bacilos Gram positivos sugestivos de *Lactobacillus* (Seta verde) e células epiteliais (seta preta) (Fotografado em CMLGS-Viseu).

Para auxiliar o diagnóstico de vaginose bacteriana são realizados alguns testes complementares como: a medição do pH (vaginose bacteriana  $\text{pH} > 4,5$ ), a adição de uma solução de hidróxido de potássio a 10% a uma gota da secreção vaginal e verificar se adquire um odor amina e a visualização da presença de *clue cells* [63].

### 5.6.3.1.2 Exame Cultural

Os exsudados vaginais são normalmente inoculados em gelose de Colombia ANC+ 5% Sangue de Carneiro (COS), Chocolate Polyvitex (PVX) e Chocolate Polyvitex (VCAT), incubados em atmosfera capnófila (5-7% de  $\text{CO}_2$ ) a  $37^\circ\text{C}$ , durante 48 horas e também em meio *Sabouraud* Gentamicina Cloranfenicol 2 (SCG2), em aerobiose a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas, sendo realizada uma observação às 24 horas.

Após a incubação, as placas são observadas e as colónias são valorizadas com base na informação obtida pelo exame microscópico. No meio PVX e VCAT pretende-se a recuperação de *Neisseria gonorrhoeae*. Assim, na presença de colónias nestes meios é realizada

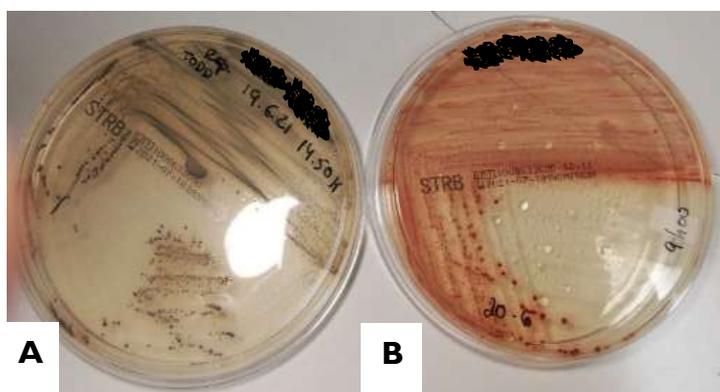
a prova da oxidase e da catalase que para o caso desta bactéria é positiva nas duas provas [65]. No caso da placa de SCG2 apresentar crescimento, procede-se à prova da filamentação para o diagnóstico presuntivo de *Candida albicans*, descrita anteriormente.

### 5.6.3.1.3 Pesquisa de *Streptococcus* do Grupo B

*Streptococcus* do Grupo B são cocos Gram positivos que podem colonizar o trato gastrointestinal e o trato genitourinário [32]. Na mulher grávida a deteção desta bactéria é fundamental, uma vez que poderá ser transmitida ao recém nascido, ocasionando uma série de complicações, sendo esta infeção uma das principais causas de morbidade e mortalidade neonatal [66].

A Direção Geral de Saúde através da Norma 37/2011 de 30/09/2011 atualizada a 20/12/2013, recomenda a deteção de *Streptococcus* do Grupo B a todas as grávidas no 3º trimestre, entre as 35 e as 37 semanas, para a profilaxia intraparto com antibioterapia, no caso de ocorrer uma deteção positiva [67].

A amostra é colhida através da introdução de uma zaragatoa a cerca de 1/3 externo da vagina e ano-retal, sendo posteriormente transportada em meio de Amies e Stuart até ao laboratório para ser analisada [67]. A zaragatoa com o exsudado vaginal/retal é semeada diretamente em caldo TODD H-T que é seletivo e permite o isolamento e enriquecimento de *Streptococcus* do grupo B destas amostras. Este caldo é incubado a 37°C durante 18-24 horas. Após este período é realizada uma nova cultura em meio ChromID Strep B (STRPB) e é incubado a 37°C em atmosfera capnófila, durante 48 horas. Este meio é cromogénico e por isso distingue as colónias de *Streptococcus* do Grupo B, permitindo realizar o diagnóstico definitivo (**Figura 6**). Estas bactérias apresentam colónias com cor vermelhas/rosas pela produção de fosfatase, enquanto que as outras bactérias apresentam colónias incolores, azuis e verdes pois hidrolisam substratos cromogéneos adicionais [50].



**Figura 6:** Exame cultural em ChromID Strep B para pesquisa de *Streptococcus* do grupo B. **A-** Exame cultural negativo para *Streptococcus* do grupo B (colónias verdes). **B-** Exame cultural positivo *Streptococcus* do grupo B (colónias rosa) (Fotografado em CMLGS-Viseu).

### **5.6.3.2. Exsudado uretral**

A uretrite é o sintoma mais comum de infecção do trato genital nos homens, que se caracteriza por uma inflamação da uretra que pode ser causada por lesão mecânica ou agentes infecciosos. Geralmente, a uretrite infecciosa é causada com maior frequência por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e menos frequentemente por *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* e Herpes simplex vírus (HSV) [58].

A colheita do exsudado uretral deve ser realizada preferencialmente, antes da primeira micção. Antes da colheita, deve ser efetuada a limpeza da mucosa circundante com uma gaze esterilizada e posteriormente introduzir com um movimento rotativo cerca de 1 cm de uma zaragatoa fina e flexível dentro da uretra. Devem ser realizadas duas colheitas com duas zaragatoas distintas, uma para o exame direto e outra para o exame cultural, sendo que esta última deve ser transportada em meio de carvão, para viabilizar bactérias patogênicas, como é o caso de *Neisseria gonorrhoeae* [28].

#### **5.6.3.2.1 Exame Microscópico**

O exame microscópico em exsudados uretrais segue os mesmos procedimentos do exsudado vaginal. Primeiramente, é realizado um exame a fresco para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, pois os homens são na maioria das vezes portadores assintomáticos deste parasita, mas em determinadas situações podem apresentar um quadro de uretrite [62].

A presença de leucócitos com bactérias intracelulares Gram negativas em diplococos é sugestivo de *Neisseria gonorrhoeae*, esta observação pode efetuar o diagnóstico, principalmente em homens [59,66].

#### **5.6.3.2.2 Exame Cultural**

O exame cultural do exsudado uretral é realizado através da inoculação no meio PVX e VCAT, com uma incubação em atmosfera capnófila a 37°C, durante 48 horas. A realização de exame cultural em meio de SCG2 é realizado quando solicitado pelo médico ou sempre que se observar uma predominância de elementos leveduriformes no exame microscópico.

### **5.6.4. Amostras do trato respiratório**

O aparelho respiratório tem como função a realização de trocas gasosas que permitem a respiração. A anatomia do trato respiratório inclui todas as estruturas envolvidas no percurso do ar do nariz aos pulmões. Estas estruturas reúnem um conjunto de barreiras à

infecção [37]. O trato respiratório é um sistema complexo dividido em trato respiratório superior e trato respiratório inferior [68].

#### **5.6.4.1. Amostras do trato respiratório superior**

O trato respiratório superior é constituído pelo nariz, seios paranasais, a nasofaringe, a orofaringe e a porção da laringe acima das cordas vocais. Esta parte do aparelho respiratório é densamente colonizada por bactérias que fazem parte da microbiota e desempenham um papel fundamental na prevenção de infeções [68]. Por vezes, ocorrem alterações nas barreiras naturais podendo desencadear uma infeção. As doenças infecciosas principais do trato respiratório superior são a faringite, a sinusite, a otite, a epiglote e a pertusis [37].

**Agentes bacterianos mais comuns:** *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* [37].

##### **5.6.4.1.1 Exsudado faríngeo**

O exsudado faríngeo é colhido numa zaragatoa de algodão, passando vigorosamente ao nível das amígdalas e da porção posterior da faringe, devendo evitar o contacto com outras estruturas anatómicas para minimizar possíveis contaminações com a microbiota envolvente [28]. No laboratório de estágio esta amostra é essencialmente utilizada para realizar a pesquisa de *Streptococcus* do Grupo A no caso de suspeita de faringite e a pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA).

##### **5.6.4.1.1.1 Pesquisa de MRSA**

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram positivos comensais ao ser humano que podem colonizar a pele e mucosas. Contudo, também são responsáveis por infeções em diversos locais do organismo nomeadamente: na corrente sanguínea, pele, tecidos moles e trato respiratório inferior [69].

A resistência a antibióticos é um problema emergente em todo mundo e está associado a uma elevada mortalidade e morbidade em infeções. Por conseguinte, existem estirpes denominadas de MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) que são resistentes à maioria das penicilinas e  $\beta$ -lactâmicos disponíveis e que estão frequentemente associadas a infeções hospitalares, apesar de existir evidência de infeções na comunidade [69].

Apesar da maioria dos indivíduos não serem portadores desta estirpe, existem indivíduos que podem ser portadores persistentes ou transitórios desta bactéria. Estes indivíduos tornam-se assim, um potencial reservatório de estirpes MRSA [69]. De modo, a controlar e prevenir a colonização e infeção por MRSA em hospitais e unidades de internamento em cuidados continuados, a Direção Geral da Saúde através da Norma 018/2014 de 09/12/2014 atualizada a 27/04/2015 reúne um conjunto de situações em que é essencial o diagnóstico laboratorial para detetar estirpes MRSA [70]. No contexto do laboratório de estágio a maioria das deteções de MRSA é realizada para o internamento ou pré-operatório.

O diagnóstico laboratorial baseia-se no exame cultural de um exsudado nasal e/ou faríngeo em meio de Chapman (MSA2) com a colocação de um disco de difusão de Cefoxitina. A zaragatoa é colocada em solução salina e de seguida é semeada por espalhamento no meio. A placa é incubada a 37°C em aerobiose, durante 24 a 48 horas sendo que é realizada uma observação nas 24 horas. O meio MSA2 é um meio seletivo e diferencial contendo manitol que é fermentado pelo *S. aureus*, o que resulta numa produção de ácidos e numa diminuição do pH do meio (a cor do indicador de pH altera de vermelho para amarelo).

#### **5.6.4.1.2 Exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo**

Desde o início da pandemia de COVID-19 em março de 2020, que o laboratório de estágio realiza a deteção de SARS-CoV-2, maioritariamente através de testes imunocromatográficos e ocasionalmente em situações pontuais do Hospital CUF, em RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*), no equipamento GeneXpert.

O exsudado nasofaríngeo é realizado através da inserção da zaragatoa numa das narinas paralelamente ao palato, até sentir uma ligeira resistência. A zaragatoa deve permanecer alguns segundos, para a absorção das secreções e deve ser removida lentamente com movimentos rotativos. O exsudado da orofaringe é realizado através da inserção da zaragatoa na cavidade oral até à faringe posterior, evitando tocar na língua. As zaragatoas devem ser transportadas em meio de transporte para vírus [71].

O vírus responsável pela pandemia de COVID-19 é o vírus SARS-CoV-2 que pertence à família *Coronaviridae*, é um vírus envelopado com uma cápside helicoidal e um genoma de RNA de cadeia simples [72].

O equipamento GeneXpert realiza o processamento das amostras, a extração do ácido nucleico, a amplificação por RT-PCR do RNA de cadeia simples do genoma do SARS-CoV2 e a deteção do *amplicon* num único cartucho. O RT-PCR permite a deteção do gene da

nucleocápside (N2) e o gene do envelope (E), com emissão de resultados em cerca de 45 minutos [73].

#### **5.6.4.2. Amostras do trato respiratório inferior**

O trato respiratório inferior é constituído pela porção da laringe abaixo das cordas vocais, traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos [68]. As infeções nestas estruturas podem surgir devido à inalação de aerossóis infecciosos, através da aspiração de conteúdo oral ou gástrico e, em situações menos frequentes, pela disseminação hematogénea. Os microrganismos podem proliferar e ultrapassar as barreiras do trato respiratório superior, atingindo as vias áreas inferiores até ao parênquima pulmonar, desencadeando uma infeção. [37].

As patologias do trato respiratório inferior são a bronquite e bronquiolite, mais frequentes de origem viral, pneumonia adquirida na comunidade, pneumonia nosocomial, pneumonia por aspiração e pneumonia crónica [37]. O historial clínico do doente é importante para poder interpretar e valorizar o diagnóstico microbiológico. As amostras mais frequentes no laboratório de estágio para a análise microbiológica são a expetoração, os lavados brônquicos e secreções brônquicas.

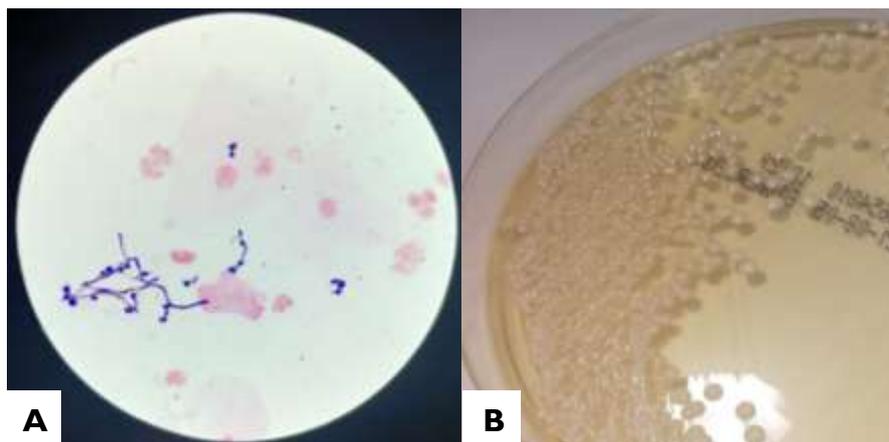
**Agentes infecciosos mais comuns:** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, Bacilos Gram negativos, *Legionella pneumophila*; *Mycobacterium tuberculosis* [37].

##### **5.6.4.2.1 Expetoração, secreções brônquicas e lavados brônquicos**

A expetoração é a amostra mais usual para o diagnóstico microbiológico, pela sua facilidade de obtenção [37]. A colheita é obtida preferencialmente com a primeira expetoração da manhã. Esta deve ser colhida previamente à higiene oral e o doente deve colher a expetoração através de tosse profunda, evitando saliva. Os lavados brônquicos são obtidos por broncoscopia e as secreções brônquicas obtidas através de aspiração. Todas as amostras são colhidas em frascos estéreis [28].

Os produtos biológicos são sujeitos à realização de dois esfregaços para a coloração de Gram e a coloração de Wright. A coloração de Gram vai permitir perceber se há alguma morfologia bacteriana predominante e que poderá ser o agente infeccioso. O exame microscópico pode ser útil para realizar o exame cultural com outro meio para além dos definidos nas *guidelines* como é o caso, quando há observação de leveduras e pseudofilamentos

(Figura 7). A coloração de Wright vai permitir visualizar mais facilmente células epiteliais e leucócitos.



**Figura 7: Diagnóstico laboratorial de secreção brônquica.** A- Exame microscópico com objetiva de 100x de secreção brônquica em coloração de Gram de um esfregaço com predominância de elementos leveduriformes com pseudohifas. B- Exame cultural da secreção brônquica em SCG2, com crescimento de colônias sugestivas de *Candida* (Fotografado em CMLGS-Viseu).

As amostras de expetoração podem ser contaminadas pela microbiota da orofaringe, o que poderá interferir no isolamento dos patógenos e dificultar a interpretação dos resultados [37]. Desse modo, é realizada uma avaliação da qualidade da amostra, através da observação do esfregaço da coloração de Gram com a objetiva de 10x e efetua-se a contagem do número de células epiteliais e de leucócitos. A avaliação da qualidade da amostra é baseada nos critérios de Murray e Washington (**Tabela VIII**) e é considerada uma boa amostra quando a expetoração está inserida no Grupo 4 e 5 [28].

**Tabela VIII:** Critérios de Murray e Washington para a avaliação da qualidade de amostra do trato respiratório inferior [28].

	Células epiteliais/campo	Leucócitos/campo
<b>Grupo 1</b>	25	10
<b>Grupo 2</b>	25	10-25
<b>Grupo 3</b>	25	25
<b>Grupo 4</b>	10-25	25
<b>Grupo 5</b>	<10	25

O exame cultural é realizado através da inoculação em MCK, incubado em aerobiose a 37°C; em meio de Chocolate Haemophilus 2 (HAE2) e COS incubado em atmosfera capnófila a 37°C, durante 48 horas. A gelose de COS é semeada com um disco de difusão de antibiótico de Optoquina que permite realizar o diagnóstico presuntivo de *Streptococcus pneumoniae*.

A gelose de MCK é utilizada para o isolamento de microrganismos Gram Negativos que poderão estar na origem da infeção, nomeadamente bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

A gelose de COS permite o crescimento de bactérias exigentes e a detecção de hemólise, que se caracteriza por uma descoloração do meio devido à lise dos eritrócitos existentes. Esta detecção auxilia o diagnóstico, visto que a presença de colónias que produzem  $\alpha$ -hemólise (lise parcial) poderão ser presuntivas de *Streptococcus pneumoniae* e a presença de colónias  $\beta$ -hemolíticas (lise total) pode ser sugestivo de *Streptococcus pyogenes* ou *Staphylococcus aureus* [26,33,74].

A gelose HAE é um meio seletivo que permite o isolamento de bactérias do género *Haemophilus* em amostras polimicrobianas [54]. Estas bactérias são bacilos Gram negativos, por vezes pleomórficos que se encontram presentes nas mucosas. O seu crescimento requer a suplementação do meio com os fatores estimuladores de crescimento, a hemina (fator X) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD ou fator V). Este meio de chocolate é suplementado com estes fatores o que permite o isolamento de *Haemophilus influenza* que é a espécie predominante em infeções do trato respiratório inferior [76].

A valorização do exame cultural e do exame microscópico é realizado pelo diretor clínico. Posteriormente realiza-se a identificação bacteriana e aos testes de suscetibilidade antibacteriana.

#### **5.6.4.2.1.1 Pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis***

As bactérias do género *Mycobacterium* são bacilos, aeróbios estritos, ácido-álcool resistentes. As infeções associadas a estas bactérias incluem: doenças pulmonares, infeções cutâneas e sistémicas. *Mycobacterium tuberculosis* é intracelular e possui a capacidade de estabelecer uma infeção crónica. Normalmente, os sinais clínicos são a nível do trato respiratório inferior através de pneumonia e em casos críticos poderá estar disseminada pelo organismo [77].

As amostras do trato respiratório inferior são sujeitas previamente a uma homogeneização, descontaminação e concentração através de reagentes da casa comercial bioMérieux para o tratamento de expetorações. Este tratamento permite eliminar a microbiota associada e concentrar os microrganismos ácido-álcool resistentes, de modo a facilitar a observação microscópica.

A pesquisa de *Mycobacterium* no laboratório de estágio é realizada através do exame microscópico em coloração de Ziehl-Neelsen, que permite confirmar de uma forma rápida a presença destes microrganismos, pois a detecção de um bacilo ácido-álcool resistente é suficiente para um resultado positivo [77]. Após um resultado positivo para bactérias ácido-

álcool resistentes e/ou o médico faz a requisição para a pesquisa de *Mycobacterium* é realizado o exame cultural.

O exame cultural é realizado em meio de Löwenstein-Jensen (LJ-T) que favorece o crescimento destes microrganismos e inibe o crescimento de outras bactérias associadas à amostra, através do verde malaquita impregnado no meio [54]. Estes microrganismos apresentam um crescimento lento e por isso a sua incubação ocorre durante 60 dias, a 37°C em aerobiose sendo que, é realizada uma observação semanalmente e é efetuado um registo pelos técnicos. As colónias de *M. tuberculosis* adquirem um aspeto característico de couve flor [54].

#### 5.6.5. Amostras da pele e de tecidos moles

A pele é o maior órgão do corpo humano e é constituída por três camadas: a epiderme, derme e a hipoderme. Este órgão desempenha funções importantes para o organismo, pois participa na regulação da homeostase e é uma das primeiras barreiras de defesa [77,78].

A pele é um ecossistema complexo e dinâmico colonizado por bactérias, fungos, vírus e *Archaea*, capazes de tolerar as características físicas e químicas da pele [79,80]. Devido a perturbações no equilíbrio da microbiota da pele através de um trauma, ulceração ou inflamação cutânea pré-existente ocorre a quebra da barreira protetora, permitindo aos agentes patogénicos proliferar pela superfície cutânea, desencadeando uma infeção [78].

As infeções da pele e dos tecidos moles podem envolver mais do que uma estrutura anatómica e podem ser resultado de um processo primário ou o resultado de uma manifestação de infeção sistémica. Perante estes fatores é essencial no diagnóstico ter em conta o local da infeção, o historial clínico do doente, o tipo de infeção e o modo de colheita, para realizar uma correta interpretação dos resultados microbiológicos [28,77].

As amostras mais frequentes no laboratório CMLGS em Viseu para o diagnóstico de infeções da pele e de tecidos moles são exsudados de feridas, frequentes em contexto de ambulatório e a nível hospitalar exsudados purulentos e feridas cirúrgicas.

**Agentes infecciosos mais comuns:** *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus* spp.; *Streptococcus*  $\beta$ -hemólíticos; *S. pyogenes*; *Staphylococci* Coagulase Negativa; *Enterobacteriaceae* [78].

### **5.6.5.1. Exsudados de feridas e exsudados purulentos**

Os exsudados de feridas são obtidos com zaragatoa que é transportada para o laboratório em meio de Stuart ou Amies [28]. O procedimento laboratorial inicia-se com a elaboração de um esfregaço com o conteúdo da zaragatoa, para a coloração de Gram. Esta primeira análise é importante para perceber se existe predominância morfológica de algum microrganismo. Em seguida é realizado o exame cultural através de uma suspensão bacteriana, obtida com a zaragatoa em solução salina e é realizada a inoculação em meio de MCK em aerobiose a 37°C, durante 24 horas para o isolamento de bactérias Gram negativas; em gelose Colombia ANC+ 5% Sangue de Carneiro (CNA) ou COS incubado com uma atmosfera capnofílica a 37°C, durante 48 horas para o isolamento de bactérias Gram positivas. Posteriormente, é feita a interpretação do exame cultural com base na observação microscópica.

O meio COS e CNA são constituídos por sangue e permitem a caracterização de bactérias pela sua atividade hemolítica, tal como descrito anteriormente. Esta detecção é fundamental para um diagnóstico presuntivo [75].

A nível hospitalar é frequente a análise de amostras como pus e exsudados de feridas cirúrgicas. Para estas amostras são realizados dois esfregaços para a coloração de Gram e coloração de Wright.

Consequente, é realizado o exame cultural em MCK em aerobiose a 37°C, durante 24 horas; nos meios PVX e CNA em atmosfera capnofílica a 37°C, durante 48 horas e no meio de enriquecimento de Caldo Coração-Cérebro (BHI-T). Para o caso em que ocorre crescimento no meio BHI-T (ocorre turvação no caldo) é realizada a repicagem do conteúdo do caldo para meios sólidos descritos.

### **5.6.6. Hemocultura**

O sangue é habitualmente estéril, no entanto em determinadas ocasiões, poderão existir bactérias na corrente sanguínea, uma situação denominada por bacterémia. Esta condição nem sempre significa infeção, poderá ser uma situação transitória e autolimitada, sem consequências clínicas graves. Contudo, em indivíduos imunodeprimidos ou indivíduos sujeitos a tratamentos de quimioterapia, a bacterémia inspira uma maior preocupação visto que, poderá desencadear graves consequências clínicas. As situações de bacterémia estão associadas com maior frequência a hospitalização, procedimentos médicos invasivos como introdução de cateteres [82].

As infecções por bactérias na corrente sanguínea podem ter origem primária em que a bactéria entra diretamente para a corrente sanguínea através de uma fonte endovascular, como um cateter intravenoso contaminado; mas também origem secundária, isto é, a bactéria é proveniente de uma fonte extravascular, por exemplo infecções não tratadas noutros locais do organismo. As infecções no sangue podem desencadear um quadro clínico grave com múltiplas respostas fisiológicas sistêmicas, podendo levar a falência de órgãos [82].

**Agentes bacterianos mais comuns:** *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* [82].

A colheita do sangue é realizada em garrafas de hemocultura aeróbias e anaeróbias da BD™ para a introdução no equipamento BACTEC 9050™. O procedimento da colheita deve ter em conta a correta desinfecção da pele para evitar contaminações da microbiota (pseudobacterémia) assim como, o volume de sangue necessário que é estipulado por cada casa comercial das garrafas de hemocultura [28]. Após a colheita, as garrafas de hemocultura são processadas de imediato no equipamento BACTEC 9050™, que permite monitorizar o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> produzido por microrganismos em crescimento na hemocultura, através de um sensor fluorescente localizado no fundo de cada garrafa [83]. O equipamento emite um alerta para o caso de crescimento de microrganismos.

Em caso de hemocultura positiva, é realizado um esfregaço em coloração de Gram do conteúdo da garrafa para visualizar a morfologia das bactérias e o clínico é informado de imediato. Por fim, é realizada a inoculação do conteúdo da hemocultura em meio COS e PVX, com uma incubação a 37°C, em atmosfera capnófila durante 24/48 horas.

#### 5.6.7. Líquidos de cavidades serosas

Os líquidos de cavidades serosas como o líquido pleural, peritoneal, ascítico, sinovial são estéreis e por isso os microrganismos isolados através destas amostras devem ser valorizados [28].

A colheita destas amostras é realizada em recipiente esterilizado com técnica asséptica. Deve ser feita a colheita do volume recomendado para o estudo bacteriológico no mínimo 1 mL de amostra. Também pode ser realizada a colheita destes produtos biológicos em frascos de hemocultura. Para o estudo de bactérias anaeróbias deve ser utilizado um meio de transporte próprio [28].

No CMLGS em Viseu, o procedimento laboratorial inicia-se com a observação do aspeto macroscópico do líquido seroso. As amostras com aspeto turvo são inoculadas diretamente no meio de cultura, por outro lado se esta apresentar um aspeto límpido é realizada uma centrifugação para a concentração da amostra, sendo que o exame cultural e microscópico é realizado através do sedimento obtido [28].

O exame direto é efetuado através de um esfregaço da coloração de Gram e de seguida o exame cultural com a inoculação em meio CNA e PVX em atmosfera capnófila, a uma temperatura de 37°C durante 48 horas; MCK incubado em atmosfera de aerobiose a 37°C durante 18 horas e em meio de enriquecimento BHI-T. No caso de apresentar crescimento no caldo de enriquecimento BHI-T é realizada a inoculação nos meios sólidos descritos, com o conteúdo do caldo.

## 6. Hematologia

---

A Hematologia é a área analítica que estuda as células do sangue assim como, as inúmeras patologias relacionadas com as células sanguíneas.

No CMLGS em Viseu esta área laboratorial é realizada na sala de Hematologia, onde se encontram vários equipamentos: o Sysmex XT-4000i™, o Sysmex XT-1800i™, o Ves-Matic CUBE 30 e o PREMIER Hb9210. Para além disso, nesta sala encontra-se o microscópio ótico para a observação dos esfregaços de sangue periférico. Os testes de coagulação também fazem parte desta área laboratorial, no entanto o equipamento Sysmex CA-500, encontra-se na sala polivalente. Todos os equipamentos são sujeitos a um controlo interno diário a pelo menos dois níveis distintos.

As atividades desenvolvidas ao longo do estágio contribuíram para um maior conhecimento dos equipamentos desta área analítica, através da introdução dos controlos internos diários, a manutenção semanal dos equipamentos e a introdução das amostras diárias. Paralelamente, foi possível realizar esfregaços de sangue periférico e a sua respetiva coloração, a observação das várias linhagens celulares maduras e imaturas no microscópio ótico e a observação da realização de programas de avaliação externa da qualidade.

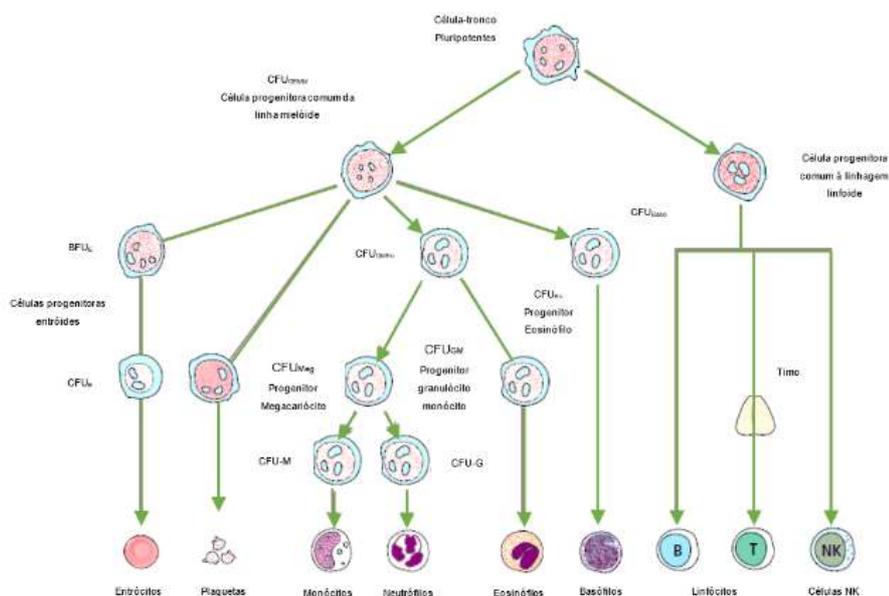
A Hematologia é uma área complexa e, desse modo, neste relatório é realizada uma introdução dos conteúdos teóricos essenciais para a prática laboratorial no contexto do estágio, a determinação dos parâmetros laboratoriais e a sua utilidade no diagnóstico das patologias hematológicas mais frequentes.

## 6.1. Hematopoiese

Durante o desenvolvimento fetal o fígado, baço e medula óssea são os principais órgãos hematopoiéticos. Durante a infância e a vida adulta, esta função é exclusiva das células hematopoiéticas da medula óssea sendo esta, o único órgão hematopoiético em condições fisiológicas normais. Na infância a medula óssea é constituída exclusivamente por células hematopoiéticas e ao longo da vida do indivíduo, ocorre a reposição progressiva de tecido adiposo na medula óssea ao longo dos ossos longos. Por isso, na vida adulta as células hematopoiéticas deste órgão restringem-se ao esqueleto central e às extremidades proximais dos fêmures e úmeros [84].

A hematopoiese corresponde à formação de células sanguíneas através de células-tronco hematopoiéticas (HSCs). Estas células pluripotentes dão origem às células progenitoras de cada linhagem celular e possuem a capacidade de se auto-renovarem (**Figura 8**) [85]. As células progenitoras da linhagem mielóide permitem a formação de eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e plaquetas. Enquanto, as células progenitoras da linhagem linfóide possibilitam a formação dos linfócitos. A formação de células sanguíneas é um processo complexo, regulado por fatores de crescimento e hormonas que permitem a divisão e a diferenciação celular [84].

A medula óssea poderá aumentar a formação de células sanguíneas em determinadas situações patológicas como anemia e infecção, de modo a compensar a perda de células sanguíneas [85].



**Figura 8: Diagrama esquemático da hematopoiese.** Representação das células tronco progenitoras na medula óssea e as várias linhagens celulares que derivam (Adaptado de [84]).

### **6.1.1. Eritropoiese**

A medula óssea produz cerca de  $10^{12}$  eritrócitos por dia, através da eritropoiese, um processo regulado pela eritropoetina, que é uma hormona produzida maioritariamente no rim. O estímulo para a produção desta hormona é desencadeado pela tensão de  $O_2$  no tecido renal, levando a um aumento do recrutamento do número de células progenitoras envolvidas na eritropoiese na medula óssea [86].

### **6.1.2. Leucopoiese**

Os granulócitos e os monócitos são formados na medula óssea por uma célula precursora comum [87].

Os linfócitos B e T são produzidos na medula óssea através de uma célula progenitora comum. Posteriormente, os linfócitos T seguem para um processo de maturação no Timo [88].

### **6.1.3. Trombopoiese**

As plaquetas são produzidas na medula óssea através da fragmentação do citoplasma do megacariócito. A célula precursora do megacariócito resulta do processo de diferenciação de HSCs e denomina-se por megacarioblasto. A formação de plaquetas é um processo regulado através da trombopoietina que é produzida no fígado e rins. Esta hormona permite o aumento da taxa de maturação dos megacariócitos através de recetores específicos, permitindo a formação de plaquetas [89].

## **6.2. Hemograma**

O hemograma é uma análise laboratorial quantitativa que, permite a avaliação das várias células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Esta análise pode fornecer informações relevantes para o diagnóstico e auxiliar nas etapas seguintes do diagnóstico diferencial de diversas patologias hematológicas [90].

O CMLGS em Viseu realiza o hemograma através dos equipamentos, Sysmex XT-4000i™ e Sysmex XT-1800i™. Esta análise é realizada no laboratório de estágio com bastante frequência, quer para a análise de rotina e controlo de doenças hematológicas em contexto de ambulatório, como em situações de urgência e de internamento do Hospital CUF. As amostras de ambulatório são analisadas nos dois equipamentos, no entanto, as amostras do Hospital CUF e de carácter urgente são processadas no Sysmex XT-4000i™.

O sangue total é a amostra usual para a determinação do hemograma e é obtido através de um tubo com anticoagulante EDTA K3. O EDTA é um agente quelante de íons de cálcio que se liga irreversivelmente a estes íons, impedindo a coagulação do sangue *in vitro*. Este anticoagulante tem a particularidade de preservar os componentes celulares e a morfologia das células sanguíneas [91].

No equipamento Sysmex XT-4000i™ é ainda realizado a determinação de parâmetros hematológicos em líquidos biológicos. Durante o tempo de estágio foi possível observar a determinação da contagem de eritrócitos, a contagem diferencial de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) e a contagem total de células sanguíneas em LCR, líquido sinovial e líquidos serosos.

Estes equipamentos utilizam diversas tecnologias para a deteção dos vários parâmetros do hemograma (**Tabela IX**), emitindo alertas quando detetam linhagens celulares anormais (granulócitos imaturos, linfócitos atípicos, blastos) no sangue periférico e possíveis alterações morfológicas das células sanguíneas. Estes alertas são sempre confirmados em esfregaço de sangue periférico.

A contagem de células sanguíneas como eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT) são realizadas através de impedância. Esta metodologia baseia-se no princípio de Coulter, em que a contagem das células é realizada através da determinação das alterações de condutividade de um meio condutor, durante a passagem das células sanguíneas num pequeno orifício entre dois elétrodos. As células sanguíneas são consideradas más condutoras de eletricidade e por isso, a sua passagem pelo orifício gera uma diminuição da condutividade do meio e um aumento da resistividade [92]. Simultaneamente à contagem de RBCs é realizada a determinação do Hematócrito (Hct) [93].

A determinação de hemoglobina (Hb) é realizada pelo método lauril sulfato de sódio (SLS). Este método inicia-se com a lise dos RBCs, através da adição de surfactantes à amostra, o que permite a libertação de hemoglobina. As globinas são alteradas pelo grupo alquil hidrofílico de lauril sulfato de sódio, induzindo a conversão de hemoglobina do estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) ao férrico ( $Fe^{3+}$ ) originando metemoglobina. Esta molécula vai complexar com SLS, originando o complexo SLS-Hb, que é analisado através de espectofotometria [94].

A citometria de fluxo é a metodologia utilizada para a contagem diferencial de leucócitos (WBC), a contagem de reticulócitos (RET) e a contagem de granulócitos imaturos (IG). Esta metodologia analisa as células sanguíneas através da dispersão de luz visível, com medições em duas direções distintas. A direção frontal (FSC) determina o tamanho das células sanguíneas, enquanto a direção lateral (SSC) determina a complexidade celular (densidade do núcleo, granularidade da célula) [95]. Para complementar esta metodologia, os equipamentos

utilizam um corante para ácidos nucleicos, que através da leitura por fluorescência, detetam o DNA e RNA das células o que permite uma maior precisão na identificação das células sanguíneas. Esta técnica é realizada pelo equipamento para a contagem de glóbulos vermelhos nucleados (NRBC) [96,97].

**Tabela IX:** Parâmetros analisados no hemograma pelos equipamentos Sysmex XT-4000i™ e Sysmex XT-1800i™, e as respectivas metodologias.

Parâmetros	Unidades	Metodologia	Valores de Referência*
<b>Eritrograma</b>			
Hb	g/dl	Reagente livre de cianeto laurilsulfato de sódio (SLS) com detecção por espectrofotometria	♀:12,0-15,0 ♂:13,0-17,0
RBC	X10 <sup>6</sup> /μl	Impedância	♀:3,80-4,80 ♂:4,50-5,50
Hct	%	Alturas de pulsos cumulativos de todas as contagens de eritrócitos [93]	♀:36,0-46,0 ♂:40,0-50,0
VCM	fl	$VCM = \frac{HT}{RBC} \times 10^{**}$	80,0-97,0
HCM	pg	$HCM(pg) = \frac{HB}{RBC} \times 10^{**}$	27,0-32,0
CHCM	g/dl	$CHCM(g/dL) = \frac{HB}{HCT} \times 100^{**}$	32,0-36,0
RDW	% ou fl	RDW-SD (fl)** RDW-CV (%)**	11,6-14,0
RET***	% ou X10 <sup>9</sup> /L	Fluorescência	50-150 [86]
<b>Leucograma</b>			
WBC	X10 <sup>3</sup> /μl	Citometria de fluxo e fluorescência	4,0-10,0
NEUT	% ou X10 <sup>3</sup> /μl		40,0-80,0
EO			1,00-6,00
BASO			0,00-2,00
LYMPH			20,00-40,00
MONO			2,00-10,00
<b>Trombocitograma</b>			
PLT	X10 <sup>3</sup> /μl	Impedância e fluorescência	150-400

\* do CMLGS em Viseu; \*\* Parâmetros calculados [86]; \*\*\* Realizado apenas no Sysmex XT-4000i™

## 6.2.1. Eritrograma

### 6.2.1.1. Contagem total de Eritrócitos

Os eritrócitos são células sem núcleo, que apresentam uma estrutura única, responsável pelas suas características antigénicas, de transporte e mecânicas [85]. Estas células permitem realizar as trocas gasosas entre os tecidos e os pulmões e vice versa, uma vez que transportam a hemoglobina [86]. Os glóbulos vermelhos possuem a capacidade de gerar energia, através do metabolismo anaeróbio [86].

Os eritrócitos têm uma vida média de cerca de 120 dias e após esse período, são removidos da circulação sanguínea, através dos macrófagos do sistema reticuloendotelial, em

especial na medula, mas também no fígado e no baço, onde irão ser degradados. Os seus constituintes poderão entrar novamente em circulação para serem utilizados ou são eliminados do organismo [98].

As alterações no número de eritrócitos em circulação geralmente são devidas a uma diminuição destas células sanguíneas, podendo desencadear anemia. Isto resulta de diversos fatores, nomeadamente: a produção defeituosa de eritrócitos na medula óssea, a redução da vida média dos eritrócitos em circulação por hemólise ou perda de sangue e retenção aumentada de eritrócitos no baço. A anemia pode ser isolada ou estar associada a uma pancitopénia que se caracteriza por uma redução de todas as linhagens das células sanguíneas em circulação [99].

Por outro lado, poderá ocorrer o aumento do número de eritrócitos na circulação sanguínea, a policitémia, que está associada a um aumento simultâneo de hemoglobina e do hematócrito. Este desequilíbrio trata-se de uma condição rara e as principais causas são as síndromes mieloproliferativas e a policitémia vera [99].

#### **6.2.1.2. Concentração de Hemoglobina**

A hemoglobina permite o transporte de  $O_2$ ,  $H^+$  e  $CO_2$  no eritrócito. Esta proteína é um tetrâmero com dois pares de cadeias polipeptídicas ligadas por ligações não covalentes. A maioria da hemoglobina do adulto é a HbA que é constituída por  $\alpha_2\beta_2$ , mas também tem pequenas quantidades de HbA<sub>2</sub>( $\alpha_2\delta_2$ ) e HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Cada cadeia polipeptídica encontra-se ligada covalentemente a um grupo Heme [86].

A concentração de hemoglobina permite auxiliar o diagnóstico de anemia, pois esta patologia é definida como a redução de concentração de hemoglobina abaixo do intervalo de referência de acordo com a idade e o sexo do doente. Geralmente a redução de hemoglobina está associada a uma redução de eritrócitos e diminuição do hematócrito [100].

#### **6.2.1.3. Hematócrito**

O hematócrito é a fração ocupada pelos eritrócitos na massa sanguínea, após a centrifugação [101]. Geralmente o hematócrito encontra-se abaixo dos valores de referência em situações de anemia e acima dos valores de referência em situações de desidratação [102].

#### **6.2.1.4. Constantes eritrocitárias**

As constantes eritrocitárias como a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e o volume corpuscular médio (VCM) são

calculadas através de fórmulas teóricas pelo equipamento, após a determinação de hemoglobina, número de eritrócitos e hematócrito. Estes parâmetros analíticos são especialmente úteis para classificar a anemia. Esta classificação baseia-se no tamanho dos eritrócitos (através do VCM) e do conteúdo em hemoglobina (através do HCM), o que permite sugerir a natureza do defeito primário ou indicar uma anomalia subjacente para a origem da anemia (**Tabela X**) [86].

**Tabela X:** Classificação da Anemia com base nas constantes eritrócitárias [100].

<b>Anemia</b>		
<b>Microcítica, hipocrômica</b>	<b>Normocítica e normocrômica</b>	<b>Macrocítica</b>
VCM < 80 fL HCM < 27 pg	VCM 80 – 95 fL HCM ≥ 27 pg	VCM > 95 fL
<b>Causas</b>		
Deficiência de Ferro; Talassemias; Anemia das doenças crônicas; Intoxicação por chumbo; Anemia sideroblástica congênita.	Anemias hemolíticas; Anemia das doenças crônicas; Hemorragia aguda; Falha renal.	Anemia megaloblástica; Doença hepática; Álcool; Hipotireoidismo; Drogas; Falência medular.

O índice de variação de eritrócitos (RDW) é uma constante eritrocitária que permite fornecer informações acerca da variação de tamanho (anisocitose) na população de eritrócitos. O RDW dentro dos valores de referência indica que os eritrócitos são uniformes entre si a nível de tamanho, enquanto, um RDW alto indica uma variação de tamanho entre os eritrócitos. Este parâmetro é útil para diferenciar anemia microcítica desencadeada por deficiências de ferro, dado que geralmente o RDW está acima dos valores de referência [103].

#### **6.2.1.5. Contagem de reticulócitos**

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos que contêm restos de ácido ribonucleico (RNA) ribossômico que se encontram em grandes quantidades no citoplasma das células precursoras nucleadas dos eritrócitos na medula óssea [102].

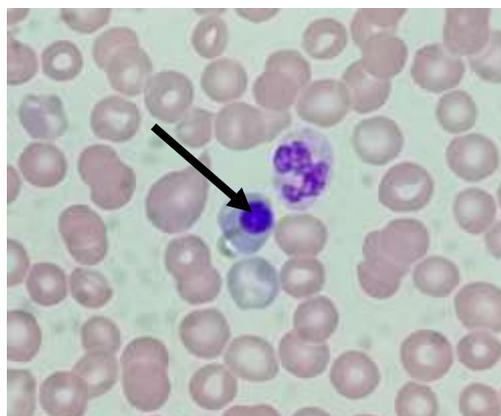
A contagem laboratorial dos reticulócitos no sangue periférico é um parâmetro importante, pois permite obter informações sobre a integridade funcional da medula óssea [104]. Em casos de hemorragia, ocorre uma resposta aumentada da eritropoetina, no sentido de produzir mais eritrócitos para compensar a sua perda, desencadeando uma liberação precoce dos reticulócitos da medula óssea para o sangue periférico. Os reticulócitos permanecem aumentados, até que os valores de hemoglobina e eritrócitos sejam regularizados no sangue periférico [86].

Por outro lado, a contagem inalterada dos reticulócitos num doente com anemia, sugere que a função da medula óssea poderá estar comprometida ou existe uma falha no estímulo da eritropoietina [86].

#### 6.2.1.6. Contagem de NRBC

Os NRBCs são células precursoras dos eritrócitos e encontram-se na medula óssea. Contudo, poderão estar presentes no sangue periférico e por isso são marcadores de eritropoiese anormal e/ou stress oxidativo. Os NRBCs (**Figura 9**) podem estar aumentados no sangue periférico devido a diversas patologias tais como: distúrbios mieloproliferativos, metástases na medula óssea de cancros sólidos. Estas células podem ser marcadores de hematopoiese extramedular ou de stress hematopoiético generalizado, como acontece em septicémia ou hemorragias agudas e ainda desempenhar um valor no prognóstico de determinadas patologias [97].

A sua determinação é importante em termos clínicos e na precisão de contagem dos leucócitos, isto porque, por vezes os NRBC podem ser contabilizados na contagem de leucócitos pelo equipamento, originando um valor elevado de leucócitos erróneo [97].



**Figura 9:** Eritroblasto (Seta preta) em esfregaço de sangue periférico com coloração de Wright e visualização com a objetiva de 100x (Fotografado em CMLGS-Viseu).

#### 6.2.2. Leucograma

Os leucócitos são células sanguíneas envolvidas na imunidade inata e adquirida do indivíduo sendo que desempenham funções importantes na defesa e na proteção contra microrganismos e substâncias estranhas [85,87].

Na avaliação quantitativa dos leucócitos, assim como no estudo das outras linhagens celulares é importante ter em conta as diversas variações fisiológicas, o sexo, a idade do indivíduo e gravidez, para a interpretação dos resultados obtidos [105]. A situação mais frequente de alterações quantitativas a nível da série branca das células sanguíneas é a leucocitose, que se caracteriza pelo aumento de leucócitos no sangue periférico [105]. Esta condição, compreende um conjunto de doenças benignas e malignas e por isso, de forma a direcionar o diagnóstico diferencial é realizada uma análise cuidadosa da contagem total e diferencial de leucócitos, para perceber a população de leucócitos predominantes.

A leucopenia é uma condição menos frequente, que se caracteriza por uma redução do número de leucócitos, devido a um aumento da destruição, redução da produção, retenção no baço ou outros órgãos das células sanguíneas. A diminuição de linfócitos, eosinófilos e basófilos em simultâneo, poderão ser desencadeados por cirurgias, traumas e infeções [105].

Na **Tabela XI** encontra-se sintetizado as causas mais comuns de alterações quantitativas dos leucócitos nas várias populações celulares.

**Tabela XI:** Principais alterações quantitativas nos leucócitos e as causas mais frequentes [87,99,105].

Leucocitose		Leucopenia	
Alterações	Causas mais comuns	Alterações	Causas mais comuns
<b>Neutrofilia</b> > $7,5 \times 10^3 / \mu\text{L}$	Infeções bacterianas; Inflamação e necrose nos tecidos; Hemólise; Hemorragia aguda; Drogas; Doenças mieloproliferativas; Gravidez; Terapia com corticosteróides.	<b>Neutropenia</b> < $2,5 \times 10^3 / \mu\text{L}$	Doença congénita; Origem medicamentosa; Infeção; Doenças autoimunes.
<b>Monocitose</b> > $0,8 \times 10^3 / \mu\text{L}$	Infeções bacterianas crónicas; Doenças do tecido conectivo; Infeções por protozoários; Leucemia mielomonocítica crónica.	<b>Eosinopénia</b> < $0,04 \times 10^3 / \mu\text{L}$	Síndrome de Cushing; Drogas; Hemodiálise.
<b>Eosinofilia</b> > $0,4 \times 10^3 / \mu\text{L}$	Alergias; Doenças parasitárias; Doenças de pele; Drogas.		
<b>Basofilia</b> > $0,1 \times 10^3 / \mu\text{L}$	Doenças mieloproliferativas.		
<b>Linfocitose</b> > $3,5 \times 10^3 / \mu\text{L}$	Infeções virais; Doenças linfoproliferativas; Infeções em crianças.		

### 6.2.3. Trombocitograma

As plaquetas têm uma vida média de 7-10 dias, desempenham uma função importante na resposta hemostática, pois permitem a formação de um tampão mecânico, em resposta a uma lesão vascular. Este papel hemostático é essencial para evitar trombozes, acidentes vasculares cerebrais e tromboembolismo venoso [89,106]. Para além da função hemostática, estas células participam em processos inflamatórios através da sua interação com leucócitos circulantes [106]. As principais alterações quantitativas das plaquetas encontram-se descritas na **Tabela XII**.

**Tabela XII:** Principais causas das alterações quantitativas das plaquetas [105,107].

Alterações	Causas mais comuns
<p><b>Trombocitopénia</b> Plaquetas: <math>&lt;130 \times 10^3 \mu\text{L}</math></p>	<p>Pseudotrombocitopénia; Aumento da destruição de plaquetas; Púrpura trombocitopénica idiopática; Infeção por HIV; Quimioterapia; Drogas; Excesso de álcool.</p>
<p><b>Trombocitose</b> Plaquetas <math>&gt;500 \times 10^3 \mu\text{L}</math></p>	<p>Trombocitose familiar; Leucemia mielóide crónica; Mielofibrose idiopática; Policitémia vera; Síndromes mielodisplásicas; Leucemia mielóide aguda; Infeções; Doenças Inflamatórias; Hemorragia; Cirurgia e trauma; Doença de Kawasaki; Deficiência de ferro.</p>

### 6.3. Esfregaço de Sangue periférico

Após a realização da avaliação quantitativa das células sanguíneas nos equipamentos, são selecionadas pelo diretor técnico amostras de sangue total para a realização do esfregaço de sangue periférico. Este processo é realizado com base nos critérios estabelecidos pelo laboratório e tendo em conta o historial clínico do doente.

Posteriormente, é realizada uma avaliação qualitativa nas amostras previamente selecionadas, com o objetivo de verificar os resultados sinalizados obtidos pelo equipamento e analisar a morfologia das células sanguíneas. Esta avaliação é realizada através da elaboração de um esfregaço sanguíneo, corado com a técnica de coloração de Wright (**Anexo V**). Para a obtenção do esfregaço de sangue, é utilizado o sangue total, colhido num tubo com anticoagulante EDTA, previamente homogeneizado. O esfregaço de sangue é realizado logo após o hemograma, para preservar as estruturas celulares.

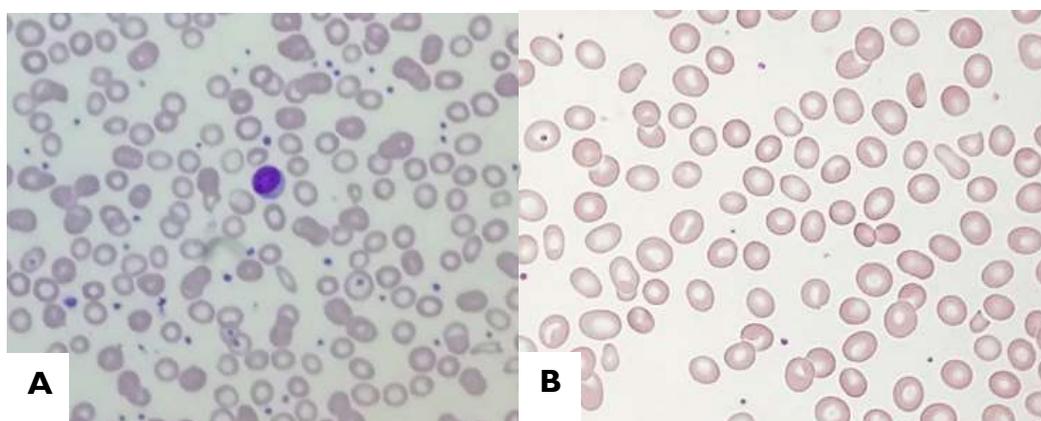
A observação do esfregaço sanguíneo no laboratório de estágio é realizada com o microscópio ótico na sala de hematologia, pelo diretor técnico. Inicialmente, a observação é realizada em pequena ampliação, normalmente com a objetiva de 10x para avaliar a qualidade do esfregaço e da coloração. Após a avaliação, é realizada a observação com a objetiva de 40x, que permite visualizar a presença de agregados plaquetares, eritrócitos em *rouleaux* e presença de parasitas. Com esta objetiva, também deve ser feita uma observação às margens

e na cauda de distensão do esfregaço, isto porque, geralmente estruturas celulares de grandes dimensões como células atípicas, granulócitos imaturos, aglomerados de células e agregados plaquetares localizam-se nestas regiões dos esfregaços. Para uma análise pormenorizada do esfregaço é realizada a visualização na objetiva de 100x, que permite ver em mais detalhe as estruturas morfológicas das células e possíveis anomalias das várias linhagens celulares [107]. A observação do esfregaço de sangue periférico deve ser realizada por toda a lâmina para uma melhor compreensão do quadro real do doente [108].

### 6.3.1. Eritrócitos

Os eritrócitos com morfologia normal, apresentam uma forma de disco bicôncavo, aproximadamente circular, com ligeiras variações a nível de forma e tamanho (diâmetro cerca de 8µm) no esfregaço de sangue periférico [109]. A morfologia normal do eritrócito depende da integridade do citoesqueleto. O surgimento de formas anómalas, pode ser o resultado de um defeito primário no citoesqueleto, na membrana celular ou devido a anomalias na sua formação [107].

Os eritrócitos podem apresentar variações no tamanho (anisocitose), em que pode haver uma diminuição de tamanho, denominada por microcítose, ou um aumento de tamanho, macrocítose (**Figura 10**) [107].



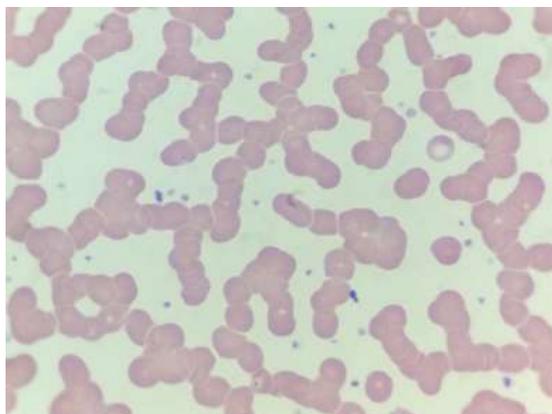
**Figura 10: Observação microscópica em ampliação de 100x de esfregaços de sangue periférico em coloração de Wright. A-**Esfregaço de sangue periférico de um doente com hemoglobina <4,4 g/dl, observa-se microcítose, hipocromia acentuada e anisocítose. (Fotografado em CMLGS -Viseu) **B-** Esfregaço de sangue periférico de um doente com anemia megaloblástica. Observa-se macrocítose moderada de eritrócitos, anisocitose e poiquilocitose. (Imagem B retirada de [110]).

A anisocromia é a alteração da cor normal do eritrócito em esfregaço de sangue periférico, podendo sofrer uma diminuição de coloração, hipocromia ou aumento da coloração hiperchromia [86,99].

Por vezes, o esfregaço de sangue periférico poderá ter duas populações distintas de eritrócitos, dimorfismo, este fenómeno é frequente em transfusões sanguíneas. Para além disso, em determinadas patologias como a mielofibrose, carcinoma metastático da medula

óssea, poderá ocorrer a presença de eritrócitos policromáticos que pelas suas características são corados a azul/arroxeados [107].

Na observação microscópica é importante avaliar todas as alterações nos eritrócitos. Ocasionalmente, os eritrócitos podem aglutinar e formar aglomerados irregulares de células sendo este facilmente desencadeado pela incorreta realização do esfregaço de sangue periférico ou devido a patologias. O empilhamento de eritrócitos denominado de *rouleaux* (**Figura II**) ocorre quando há o aumento da concentração plasmática de proteínas com elevado peso molecular em circulação. Este agrupamento de eritrócitos é frequente em indivíduos com Mieloma Múltiplo, pois encontra-se em elevadas concentrações a paraproteína monoclonal [108].



**Figura II:** Observação microscópica de esfregaço de sangue periférico em coloração de Wright de um doente com Mieloma Múltiplo. Observação de agrupamentos de eritrócitos em *rouleaux*. (Fotografado em CMLGS-Visau).

Os eritrócitos podem sofrer alterações na forma, poiquilocitose (**Tabela XIII**) que poderão estar associadas a diversas patologias [107].

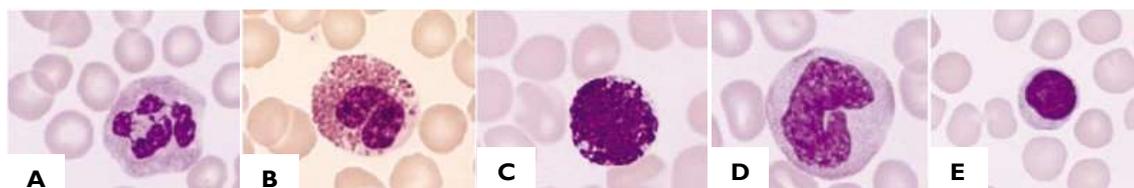
**Tabela XIII:** Alterações na forma dos eritrócitos e causas mais frequentes [100].

Forma	Causas	Forma	Causas
<b>Macrócitos</b>	Doença hepática; Alcoolismo; Anemia.	<b>Fragmentos</b>	Coagulopatia intravascular disseminada; Síndrome hemolítico-urémico; Púrpura trombocitopénica trombótica; Queimaduras; Problemas na Válvula cardíaca.
<b>Células em alvo</b>	Deficiência em Ferro; Doença Hepática; Hemoglobinopatias; Pós-esplenomegália.	<b>Microesferócito</b>	Sépsis; Anemia Hemolítica autoimune.
<b>Estomatócitos</b>	Doença hepática; Alcoolismo.	<b>Eliptócitos</b>	Eliptocitose hereditária.
<b>Célula em caneta</b>	Deficiência de Ferro.	<b>Poiquilócito em lagrima</b>	Mielofibrose; hemopoiese extramedular.
<b>Equinócitos</b>	Doença hepática; Pós esplenomegália; Artefacto após armazenamento.	<b>Célula falciforme</b>	Anemia falciforme.
<b>Acantócitos</b>	Falha renal; Doença hepática; Abetalipoproteinémia.	<b>Micrócitos</b>	Deficiência de ferro de micrócitos; Hemoglobinopatia.
<b>Esferócitos</b>	Esferocitose hereditária; Anemia hemolítica autoimune.		

### 6.3.2. Leucócitos

A avaliação qualitativa dos leucócitos é realizada através da observação do esfregaço de sangue periférico, com base na informação obtida pelo hemograma. Esta observação permite detetar alterações na morfologia normal dos leucócitos, o que pode ser útil para auxiliar o diagnóstico de diversas patologias hematológicas.

Os leucócitos com morfologia normal no esfregaço de sangue periférico encontram-se representados na **Figura 12**.



**Figura 12: Morfologia dos Leucócitos em microscopia ótica. A-** Neutrófilo. **B-** Eosinófilo. **C-** Basófilo. **D-** Monócito. **E-** Linfócito (Adaptado de [87]).

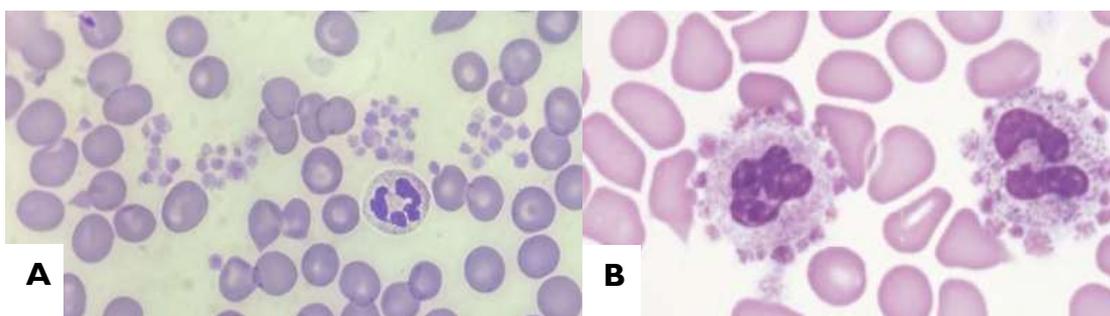
Ao longo do estágio foi possível observar esfregaços de sangue periférico com alterações qualitativas dos leucócitos. Durante este período foi possível observar alterações morfológicas nos neutrófilos, principalmente a nível do núcleo. Por vezes, nestas células pode ocorrer um desvio à esquerda, em que é possível observar no esfregaço, neutrófilos imaturos com formas em banda, metamielócitos e em situações de leucemia poderá apresentar linhagens mais imaturas, no sangue periférico. Contrariamente, poderá existir um desvio à direita em que os neutrófilos apresentam uma hipersegmentação, isto é, a presença de neutrófilos com seis ou mais lóbulos no núcleo, esta particularidade morfológica auxilia o diagnóstico de anemias megaloblásticas. Para além disso, foi possível visualizar neutrófilos com granulações e vacúolos no citoplasma que são características morfológicas desencadeadas devido a infeção bacteriana e/ou inflamação [108].

Os linfócitos são a segunda linhagem celular em que foi possível observar mais alterações morfológicas no esfregaço de sangue periférico nomeadamente situações malignas como leucemia linfocítica crónica que é caracterizada pela predominância de linfócitos pequenos e de morfologia madura e por vezes com células imaturas de maiores dimensões. Ainda foi possível visualizar esfregaços de sangue com a presença de linfócitos atípicos que normalmente estão associados a uma infeção viral ou bacteriana. Nas crianças e bebés é importante ter em conta que esta população de leucócitos encontra-se aumentada sem nenhuma patologia associada [108].

### 6.3.3. Plaquetas

As plaquetas normais apresentam contornos irregulares, com cerca de 1-3µm de diâmetro e com a presença de grânulos finos que podem estar centralizados ou por toda a célula. As principais alterações que ocorrem nas plaquetas são a nível do tamanho. Em determinadas patologias poderá haver uma predominância de plaquetas gigantes (diâmetro maior que 5µm), por exemplo em situações de trombocitopénia imune grave. Para além disso, o número de plaquetas também é variável consoante determinadas patologias, em situações de stress inflamatório agudo ou hemorragia, há um aumento de plaquetas associado [108].

Na presença de trombocitopénia no hemograma é essencial observar em microscópio, o esfregaço de sangue periférico, para avaliar a presença de uma possível pseudotrombocitopénia (**Figura 13**) dependente de EDTA, sem relevância clínica. A pseudotrombocitopénia dependente de EDTA é prevalente em cerca de 1% dos indivíduos [108]. Este efeito *in vitro* ocorre pois, o EDTA devido á sua ação de quelante catiónico, desencadeia uma alteração conformacional da membrana das plaquetas, que permite o acesso dos auto-anticorpos a estas células. Estes auto-anticorpos (maioria tipo IgG) atuam como aglutininas que reagem com as plaquetas. Na presença deste anticoagulante as plaquetas podem formar aglomerados e agrupar-se em torno dos neutrófilos, pelo fenómeno denominado de satelitismo. Os equipamentos hematológicos são incapazes de detetar estes aglomerados, assim como as plaquetas gigantes, contabilizando estas plaquetas em linfócitos e indicam uma falsa trombocitopénia [111].



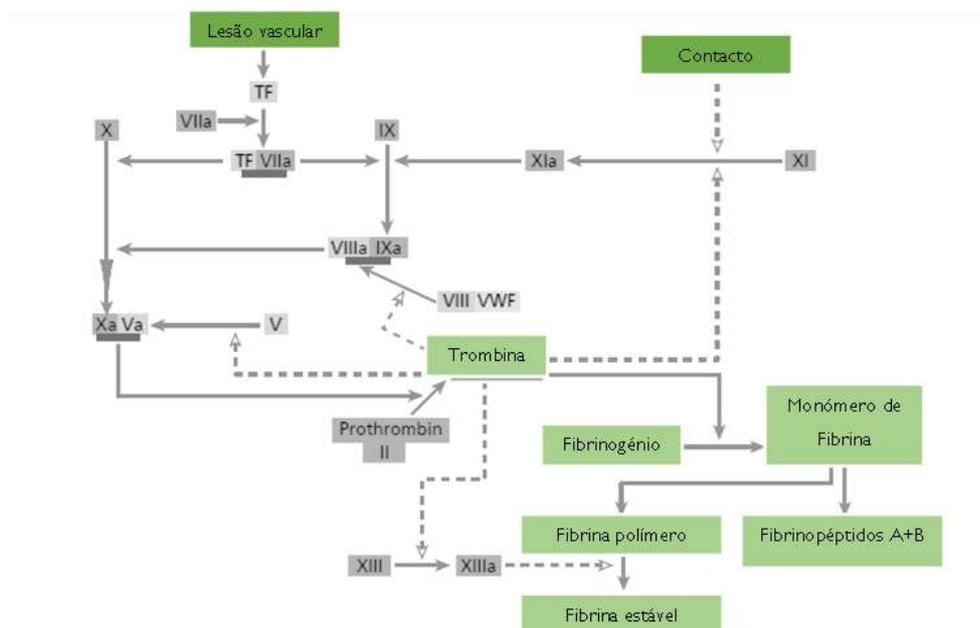
**Figura 13:** Esfregaço de sangue periférico de pseudotrombocitopénia. **A-** Observação em objetiva de 100x de agregados plaquetares (Fotografado em CMLGS -Viseu) **B-** Observação de satelitismo devido á ligação das plaquetas aos neutrófilos (Imagem retirada de [112]).

### 6.4. Hemóstase e Coagulação

A hemóstase estabelece o equilíbrio entre os mecanismos de pró-coagulação, anti-coagulação, em associação com o processo de fibrinólise. A resposta hemostática tem início num dano vascular estabelecendo a coagulação, através da formação de um coágulo, impedindo a hemorragia. Após a resolução do dano vascular é essencial remover o coágulo para evitar possíveis complicações, com processos de anticoagulação e fibrinólise. Os

principais componentes envolvidos nos processos de hemóstase são as plaquetas, os fatores de coagulação, inibidores da coagulação, fibrinólise e os vasos sanguíneos [89].

A coagulação sanguínea (**Figura 14**) inicia-se após a lesão vascular ocorrendo a ativação sequencial por proteólise, de uma cascata de proteínas precursoras circulantes, os fatores de coagulação, originando trombina que por sua vez irá converter o fibrinogénio em circulação, em fibrina. A fibrina envolve numa rede, os agregados plaquetários no local da lesão e converte os tampões plaquetários instáveis inicialmente formados em tampões hemostáticos estáveis. A cascata enzimática da coagulação requer a concentração local dos fatores de coagulação em circulação. À superfície as reações são mediadas pelo colagénio exposto, fosfolípidos plaquetários e os fatores teciduais [89].



**Figura 14: Representação da cascata da coagulação *in vivo*.** Após lesão, início da coagulação ativada pelo fator tecidual (TF) na superfície celular. O complexo TF e VIIa ativa os fatores X e IX. O complexo VIIIa-IXa aumenta a produção de Xa, a partir do X. A formação de trombina a partir de protrombina é desencadeada pela ação do complexo Xa-Va, originando fibrina. Os fatores IX, V e XIII são ativados pela trombina. A trombina separa o fator VIII e o fator de von Willebrand (VWF), desencadeando um aumento na formação do complexo VIIIa-iXa e por sua vez do complexo Xa-Va (Adaptado de [89]).

#### 6.4.1. Testes de avaliação da coagulação

Os testes de avaliação da coagulação têm como objetivo diagnosticar anomalias na via extrínseca e intrínseca da coagulação e monitorizam a terapêutica com anticoagulantes.

O CMLGS em Viseu realiza as determinações do tempo de Protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e o INR (*International Normalized Ratio*) através do equipamento Sysmex CA-500. O plasma é a amostra utilizada nos testes de avaliação da coagulação no laboratório de estágio, esta amostra é colhida num tubo com anticoagulante citrato de sódio e posteriormente centrifugado a uma rotação de 3000 rpm durante 15 minutos para a obtenção do sangue total.

O equipamento utiliza o método foto-ótico que permite a detecção de coágulos, através da emissão de luz, com um comprimento de onda de 660 nm, sobre a mistura da amostra com os reagentes. Posteriormente, é realizada uma detecção das alterações de intensidade da luz dispersa, uma vez que durante o processo de coagulação o fibrinogénio é convertido em fibrina e isto resulta, numa maior turvação que é medida. Esta metodologia compara os resultados obtidos com uma amostra padrão, com um nível de atividade conhecido [113].

#### **6.4.1.1. Tempo de Protrombina (PT)**

O tempo de protrombina avalia a via extrínseca da coagulação [114]. O equipamento realiza a medição do tempo de protrombina através da adição na amostra de tromboplastina tecidual, permitindo obter informações acerca da via extrínseca da coagulação [113].

Para além disso, o INR (*International Normalized Ratio*) é calculado com base no tempo de protrombina obtido no equipamento, este valor tem como objetivo padronizar e diminuir as variações dos diversos reagentes utilizados para a determinação do tempo de protrombina [115].

#### **6.4.1.2. Tempo de Tromboplastina parcial ativada (TTPa)**

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) é um teste de coagulação utilizado para avaliar a via intrínseca da coagulação e assim permite perceber se existem alterações nos fatores de coagulação desta via nomeadamente VIII, IX e XI. Este teste é utilizado para monitorizar a terapia anticoagulante com heparina e também permite avaliar o risco de trombose [116]. Este parâmetro é medido no equipamento através da adição à amostra de fosfolípidos e  $\text{CaCl}_2$ . Este teste depende dos fatores de contacto, os fatores VIII, IX, X, V protrombina e fibrinogénio [113].

### **6.5. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária**

A velocidade de sedimentação é um parâmetro cuja análise é muito frequente no laboratório de estágio. Este parâmetro consiste na medição da avaliação do tempo de sedimentação dos eritrócitos, em mm/h, numa amostra de sangue ao longo do tubo de ensaio. Esta análise é particularmente útil como marcador não específico de inflamação, isto porque em resposta a esta condição há um aumento da concentração das proteínas plasmáticas de fase aguda, como o fibrinogénio. Estas proteínas perturbam a precipitação fisiológica dos eritrócitos, devido à carga negativa que apresentam, desencadeiam a agregação dos eritrócitos e posterior precipitação [117,118].

Para a análise laboratorial é utilizado o equipamento Ves-Matic CUBE 30 que é um analisador automático que realiza a medição da velocidade de sedimentação dos eritrócitos em tubos de EDTA aplicando o método de Westergren modificado. Este método consiste, inicialmente, numa homogeneização automática das amostras por 2 min, de forma a garantir que ocorre uma desagregação completa dos eritrócitos. Posteriormente o aparelho realiza a leitura da coluna da amostra no primeiro ponto de leitura e as amostras vão sedimentar por 20 minutos. Utilizando um sistema de leitura ótico, o analisador determina a diferença entre as alturas da coluna de eritrócitos antes e depois da sedimentação num segundo ponto de leitura, emitindo o primeiro resultado ao fim de 22 min, e o seguinte a cada 18 segundos. Ao fim de 33 min o ensaio termina e os resultados são convertidos para valores de 60 minutos para correlacionar com o método de Westergren e a correção da temperatura para 18°C também é aplicada [118].

Em determinadas situações o equipamento não consegue realizar a leitura da coluna corretamente, e por isso realiza-se o método de Westergren. Com o tubo de EDTA previamente homogeneizado é introduzida uma pipeta de vidro à amostra, que realiza uma sucção do sangue total e é colocado durante 1 hora na posição vertical para ocorrer a sedimentação. Após esse tempo é realizada a leitura em milímetros entre o menisco do plasma e o nível da coluna dos eritrócitos sedimentados.

## 6.6. Hemoglobina Glicada

O CMLGS em Viseu realiza a determinação de HbA<sub>1c</sub> que é importante para o diagnóstico e monitorização da glucose em doentes com Diabetes *Mellitus*, pois permite obter uma retrospectiva das concentrações de glucose no sangue a longo prazo, sem as habituais variações observadas na determinação da glucose, devido ao estilo de vida do doente. Este parâmetro também permite determinar o risco para o desenvolvimento de complicações microvasculares devido á Diabetes *Mellitus* [119].

A HbA<sub>1c</sub> resulta da glicação da glucose com o N-terminal do resíduo de valina da cadeia- $\beta$  da HbA para formar uma base de Schiff instável. Por isso, esta molécula vai sofrer dissociações ou rearranjos Amadori, para formar a HbA<sub>1c</sub> que é uma molécula estável. A formação da hemoglobina glicada é irreversível e por isso, a concentração na corrente sanguínea irá depender do tempo de vida do eritrócito, assim como dos níveis de glucose no sangue. Por isso a taxa de formação de hemoglobina glicada é diretamente proporcional á concentração de glucose no sangue. A concentração de hemoglobina glicada representa valores de glucose nas 8 a 12 semanas anteriores [119].

A determinação de  $HbA_{1c}$  é realizada pelo equipamento PREMIER Hb9210 através da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de afinidade com boronato [120].

## 7. Conclusão

---

O estágio foi uma experiência enriquecedora, que permitiu perceber como funciona o mercado de trabalho e conhecer de perto a rotina diária de um técnico superior em Análises Clínicas. Desta experiência, foi possível perceber que, apesar de os laboratórios fazerem parte dos “bastidores” do hospital, desempenham um papel fundamental para o correto diagnóstico e por consequente, um tratamento mais direcionado e um melhor prognóstico. Apesar de ser uma área cada vez mais automatizada, os técnicos terão sempre um papel importante no laboratório, pois garantem o pensamento crítico e o conhecimento teórico, indispensável para garantir os melhores resultados aos utentes.

Durante o estágio, percebi que é essencial ter espírito de equipa para uma maior produtividade no trabalho diário e que, ainda é necessário quebrar a barreira que existe entre os clínicos e o laboratório, pois a comunicação entre os vários profissionais de saúde é primordial para melhores cuidados de saúde, cada vez mais personalizados face às necessidades do utente.

Em conclusão, o tempo de pandemia em que vivemos veio evidenciar ainda mais a importância desta área na sociedade, mas também teve um peso na minha formação enquanto profissional de saúde, pois frequentar um Mestrado em plena pandemia, sustentou ainda mais o meu gosto por esta área e acima de tudo permitiu-me perceber a responsabilidade que representa esta profissão dentro e fora do laboratório.

## 8. Bibliografia

---

- [1] E. Magiorkinis and A. Diamantis, “The fascinating story of urine examination: From uroscopy to the era of microscopy and beyond,” *Diagn. Cytopathol.*, vol. 43, no. 12, pp. 1020–1036, Dec. 2015.
- [2] R. B. Tattersall, “The History of Diabetes Mellitus,” *Textb. Diabetes, Fifth Ed.*, 2017.
- [3] A. Erdoğan, A. Bozkurt, A. Altun, and A. Turan, “Can we contribute to the diagnosis of diabetes and regulation of blood glucose by increasing the urologists’ awareness of glucosuria?,” *Urol. J.*, vol. 87, no. 4, pp. 209–213, May 2020.
- [4] J. Büttner, “The origin of clinical laboratories,” *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, vol. 30, no. 10, pp. 585–593, 1992.
- [5] C. Archetti, A. Montanelli, D. Finazzi, L. Caimi, and E. Garrafa, “Clinical Laboratory Automation: A Case Study,” *J. Public Health Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 31–36, Jun. 2017.
- [6] B. D. Kevadiya *et al.*, “Diagnostics for SARS-CoV-2 infections,” *Nat. Mater.*, vol. 20, pp. 593–605, Feb. 2021.
- [7] “Grupo Germano de Sousa.” Available: <https://www.germanodesousa.com/quem-somos/grupo-germano-de-sousa/>. [Accessed: 28-Sep-2021].
- [8] S. Kulkarni *et al.*, “The Cost of Pre-Analytical Errors in INR Testing at a Tertiary-Care Hospital Laboratory: Potential for Significant Cost Savings,” *Lab. Med.*, vol. 51, no. 3, pp. 320–324, May 2020.
- [9] L.-O. Gabriel, V. Waldemar, L. Giuseppe, P. Geraldo, and G. Gian Cesare, “Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 77, no. 3, pp. 153–163, Mar. 2017.
- [10] L. Sciacovelli, L. Zardo, S. Secchiero, and M. Plebani, “Quality specifications in EQA schemes: from theory to practice,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 346, no. 1, pp. 87–97, Aug. 2004.
- [11] “Análise Clínicas - Germano de Sousa - Política de Qualidade.” [Online]. Available: <https://www.germanodesousa.com/quem-somos/qualidade/>. [Accessed: 25-Sep-2021].
- [12] J. O. Westgard, “Internal quality control: planning and implementation strategies strategies:,” *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.*, vol. 40, no. Pt 6, pp. 593–611, Nov. 2003.
- [13] E. D. Johnson, J. C. Schell, and G. M. Rodgers, “The D-dimer assay,” *Am. J. Hematol.*, vol. 94, no. 7, pp. 833–839, Apr. 2019.
- [14] B. Hamade and D. T. Huang, “Procalcitonin: Where Are We Now?,” *Crit. Care Clin.*, vol. 36, no. 1, pp. 23–40, Jan. 2020.
- [15] W. F. C. Ferreira and A. F. da Fonseca, “História da Microbiologia,” in *Microbiologia*, 1st

ed., Lisboa: Lidel, 2010, pp. 23–37.

- [16] F. De Luca and Y. Shoenfeld, “The microbiome in autoimmune diseases,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 195, no. 1, pp. 74–85, Jan. 2019.
- [17] E. Salvucci, “The human-microbiome superorganism and its modulation to restore health,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 70, no. 7, pp. 781–795, Mar. 2019.
- [18] C. R. Mahon and S. Mahlen, “Host-Parasite Interaction,” in *Textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 23–28.
- [19] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, “Introduction to medical microbiology,” in *Medical Microbiology*, 8th ed., Philadelphia: Elsevier, 2016, pp. 2–4.
- [20] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, “Microscopy and in Vitro Culture,” in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, pp. 16–21.
- [21] L. Boyanova, “Direct Gram staining and its various benefits in the diagnosis of bacterial infections,” *Postgrad. Med.*, vol. 130, no. 1, pp. 105–110, 2018.
- [22] C. Vilchèze and L. Kremer, “Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative Mycobacterium tuberculosis : The Koch Paradox,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 5, no. 2, 2017.
- [23] H. Michel, J. Behr, A. Harrenga, and A. Kannt, “Cytochrome C Oxidase: Structure and Spectroscopy,” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 27, pp. 329–356, Feb. 1998.
- [24] P. Shields and L. Cathcart, “Oxidase Test Protocol,” *Am. Soc. Microbiol.*, pp. 1–9, 2010.
- [25] K. Reiner, “Catalase Test Protocol,” *American Society for Microbiology*, 11-Nov-2010. [Online]. Available: <https://asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf>. [Accessed: 07-Oct-2021].
- [26] A. Luijendijk, A. van Belkum, H. Verbrugh, and J. Kluytmans, “Comparison of five tests for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical samples,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 34, no. 9, pp. 2267–2269, 1996.
- [27] T. Matare, P. Nziramasanga, L. Gwanzura, and V. Robertson, “Experimental germ tube induction in *Candida albicans*: An evaluation of the effect of sodium bicarbonate on morphogenesis and comparison with pooled human serum,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, p. 5 pages, 2017.
- [28] A. B. Fonseca *et al.*, “Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia,” 2004. [Online]. Available: <https://www.dgs.pt/programa-nacional-de-controlo-da-infeccao/documentos/manuais-de-boas-praticas/orientacoes-para-a-elaboracao-de-um-manual-de-boas-praticas-em-bacteriologia-pdf.aspx>. [Accessed: 25-Sep-2021].
- [29] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, “Serologic diagnosis,” in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, p. 26.

- [30] D. M. Pierre, J. Baron, V. L. Yu, and J. E. Stout, "Diagnostic testing for Legionnaires' disease," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 16, no. 59, Aug. 2017.
- [31] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, "Miscellaneous Gram Negative Rods," in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, pp. 287–300.
- [32] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, "Streptococcus and Enterococcus," in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, pp. 183–201.
- [33] F. Congestrì *et al.*, "Comparative evaluation of the novel IMMUNOCATCH™ Streptococcus pneumoniae (EIKEN CHEMICAL CO., LTD) test with the Uni-Gold™ Streptococcus pneumoniae assay and the BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae antigen card for the detection of pneumococcal capsular," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 39, pp. 749–751, 2020.
- [34] C. Gateau, J. Couturier, J. Coia, and F. Barbut, "How to: diagnose infection caused by Clostridium difficile," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 24, no. 5, pp. 463–468, May 2018.
- [35] M. O. Brito, P. J. Roth, C. R. Mahon, and G. Manuselis, "Gastrointestinal Infections and Food Poisoning," in *Textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 835–853.
- [36] J. B. Simon, "The pros and cons of fecal occult blood testing for colorectal neoplasms," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 6, no. 3, pp. 397–411, Nov. 1987.
- [37] S. M. Pacheco and J. L. Cook, "Upper and Lower Respiratory Tract Infections," in *Textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 765–801.
- [38] M. Wahlgren, S. Goel, and R. R. Akhouri, "Variant surface antigens of Plasmodium falciparum and their roles in severe malaria," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, no. 8, pp. 479–491, Jun. 2017.
- [39] E. Crowley *et al.*, "Evaluation of the VITEK 2 Gram Positive (GP) Microbial Identification Test Card: Collaborative Study," *J. AOAC Int.*, vol. 95, no. 5, pp. 1425–1432, Sep. 2012.
- [40] G. Funke, D. Monnet, C. DeBernardis, A. Von Graevenitz, and J. Freney, "Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 7, pp. 1948–1952, 1998.
- [41] D. M. Livermore *et al.*, "Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 49, no. 2, pp. 289–300, Feb. 2002.
- [42] M. Ligozzi, C. Bernini, M. G. Bonora, M. De Fatima, J. Zuliani, and R. Fontana, "Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 5, pp. 1681–1686, 2002.

- [43] F. O'Grady and W. R. Cattell, "Kinetics of urinary tract infection," *Br. J. Urol.*, vol. 38, no. 2, pp. 149–155, Apr. 1966.
- [44] K. Thomas-White *et al.*, "Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1557, Dec. 2018.
- [45] K. O. Tamadonfar, N. S. Omattage, C. N. Spaulding, and S. J. Hultgren, "Reaching the End of the Line: Urinary Tract Infections," *Microbiol. Spectr.*, vol. 7, no. 3, May 2019.
- [46] G. Reid, "Urinary Tract Infections," in *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 884–900.
- [47] M. Oyaert *et al.*, "Laboratory diagnosis of urinary tract infections: Towards a BILULU consensus guideline," *J. Microbiol. Methods*, vol. 146, pp. 92–99, Mar. 2018.
- [48] M. Oyaert and J. Delanghe, "Progress in Automated Urinalysis," *Ann. Lab. Med.*, vol. 39, no. 1, pp. 15–22, Jan. 2019.
- [49] G. Echeverry, G. L. Hortin, and A. J. Rai, "Introduction to Urinalysis: Historical Perspectives and Clinical Application," *Urin. Proteome. Methods Mol. Biol. (Methods Protoc.)*, vol. 641, pp. 1–12, Mar. 2010.
- [50] J. D. Perry, "A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 449–479, Apr. 2017.
- [51] M. L. Yarbrough, M. A. Wallace, C. Marshall, E. Mathias, and C.-A. D. Burnham, "Culture of Urine Specimens by Use of chromID CPS Elite Medium Can Expedite Escherichia coli Identification and Reduce Hands-On Time in the Clinical Laboratory," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 54, no. 11, pp. 2767–2773, Nov. 2016.
- [52] A. C. Cheng, J. R. McDonald, and N. M. Thielman, "Infectious diarrhea in developed and developing countries," *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 39, no. 9, pp. 757–773, Oct. 2005.
- [53] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, "Enterobacteriaceae," in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, p. 253.
- [54] C. R. Mahon, D. C. Lehman, and G. Manuselis, *The Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed. Elsevier, 2015.
- [55] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, "Campylobacter and Helicobacter," in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, pp. 280–286.
- [56] E. Pozio, "How globalization and climate change could affect foodborne parasites," *Exp. Parasitol.*, vol. 208, no. 107807, Jan. 2020.
- [57] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, "Laboratory Diagnosis of Parasitic Disease," in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, pp. 698–706.
- [58] E. F. Keen and W. K. Aldous, "Genital Infections and Sexually Transmitted Infections,"

- in *Textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 901–932.
- [59] R. M. Brotman *et al.*, “Bacterial Vaginosis Assessed by Gram Stain and Diminished Colonization Resistance to Incident Gonococcal, Chlamydial, and Trichomonal Genital Infection,” *J. Infect. Dis.*, vol. 202, no. 12, pp. 1907–1915, Dec. 2010.
- [60] J. R. Schwebke, C. A. Muzny, and W. E. Josey, “Role of *Gardnerella vaginalis* in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: A Conceptual Model,” *J. Infect. Dis.*, vol. 210, no. 3, pp. 338–343, Aug. 2014.
- [61] E. R. Boskey, R. A. Cone, K. J. Whaley, and T. R. Moench, “Origins of vaginal acidity: high d/l lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source,” *Hum. Reprod.*, vol. 16, no. 9, pp. 1809–1813, Sep. 2001.
- [62] T. Edwards, P. Burke, H. Smalley, and G. Hobbs, “*Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis,” *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 42, no. 3, pp. 406–417, May 2016.
- [63] F. Mohammadzadeh, M. Dolatian, M. Jorjani, and H. A. Majd, “Diagnostic Value of Amsel’s Clinical Criteria for Diagnosis of Bacterial Vaginosis,” *Glob. J. Health Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 8–14, May 2014.
- [64] D. Taylor-Robinson, “The bacteriology of *Gardnerella vaginalis*,” *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, vol. 86, pp. 41–55, 1984.
- [65] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, “*Neisseria* and related Genera,” in *Medical Microbiology*, Elsevier, 2016, pp. 234–241.
- [66] C. Y. Cho *et al.*, “Group B Streptococcal infection in neonates and colonization in pregnant women: An epidemiological retrospective analysis,” *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 52, no. 2, pp. 265–272, Apr. 2019.
- [67] Direção-Geral da Saúde, “Norma nº 037/2011 de 30/09/2011 atualizada a 20/12/2013 - Exames Laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco,” 2011. Available: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0372011-de-30092011-jpg.aspx>. [Accessed: 26-Sep-2021].
- [68] W. H. Man, W. A. A. de S. Piters, and D. Bogaert, “The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, no. 5, pp. 259–270, May 2017.
- [69] S. Lakhundi and K. Zhang, “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 31, no. 4, pp. e00020-18, Sep. 2018.
- [70] Direção Geral de Saúde, “Norma 018/2014 de 09/12/2014 atualizada em 27/04/2015,” 09-Dec-2014. Available:

- [https://static.sanchoeassociados.com/DireitoMedicina/Omlegissum/legislacao2015/Mai o/Norma\\_018\\_2014.pdf](https://static.sanchoeassociados.com/DireitoMedicina/Omlegissum/legislacao2015/Mai o/Norma_018_2014.pdf). [Accessed: 06-Oct-2021].
- [71] Direção Geral de Saúde, “COVID-19: Diagnóstico Laboratorial,” 23-Mar-2020. Available: <https://www.spmi.pt/wp-content/uploads/2020/04/DGS-Orientação-diagnóstica-laboratorial.pdf>. [Accessed: 24-Oct-2021].
- [72] K. V. Holmes, “CORONAVIRUSES (CORONAVIRIDAE),” *Encycl. Virol.*, pp. 291–298, Jan. 1999.
- [73] M. J. Loeffelholz *et al.*, “Multicenter Evaluation of the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 Test,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 58, no. 8, pp. e00926-20, Jul. 2020.
- [74] L. S. Monson, “Staphylococci,” in *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 314–327.
- [75] G. Manuselis and C. R. Mahon, “Use of Colony Morphology for the Presumptive Identification of Microorganisms,” in *Textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 169–180.
- [76] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, “Haemophilus and related bacteria,” in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, pp. 242–250.
- [77] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, “Mycobacterium and related acid-fast bacteria,” in *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier, 2016, pp. 218–233.
- [78] N. M. Clark, “Skin and Soft Tissue Infections,” in *Textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 804–834.
- [79] A. S. Moffarah, M. Al Mohajer, B. L. Hurwitz, and D. G. Armstrong, “Skin and Soft Tissue Infections,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 4, Aug. 2016.
- [80] M. Egert and R. Simmering, “The Microbiota of the Human Skin,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 902, pp. 61–81, 2016.
- [81] Y. E. Chen, M. A. Fischbach, and Y. Belkaid, “Skin microbiota–host interactions,” *Nature*, vol. 553, no. 7689, pp. 427–436, Jan. 2018.
- [82] P. Mister and D. C. Lehman, “Bacteremia and Sepsis,” in *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 868–883.
- [83] F. R. Cockerill *et al.*, “Clinical comparison of BACTEC 9240 plus aerobic/F resin bottles and the isolator aerobic culture system for detection of bloodstream infections.,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1469–1472, 1997.
- [84] A. V. Hoffbrand and P. A. H. Moss, “Haemopoiesis,” in *Essential Haematology*, 6th ed., Wiley Blackwell, 2011, pp. 3–14.
- [85] M. A. Rieger and T. Schroeder, “Hematopoiesis,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 12, p. a008250, Dec. 2012.

- [86] A. V. Hoffbrand and P. A. H. Moss, "Erythropoiesis and general aspects of anaemia," in *Essential Haematology*, 6th ed., Wiley Blackwell, 2011, pp. 17–29.
- [87] A. V. Hoffbrand and P. A. H. Moss, "The white cells 1: granulocytes, monocytes and their benign disorders," in *Essential Haematology*, 6th ed., Blackwell, 2011, pp. 109–125.
- [88] A. V. Hoffbrand and P. A. H. Moss, "The white cells 2: lymphocytes and their benign disorders," in *Essential Haematology*, 6th ed., Blackwell, 2011, pp. 127–140.
- [89] A. V. Hoffbrand and P. A. H. Moss, "Platelets, blood coagulation and haemostasis," in *Essential Haematology*, 6th ed., Wiley Blackwell, 2011, pp. 315–327.
- [90] E. T. A. Thomas, S. Bhagya, and A. Majeed, "Clinical Utility of Blood Cell Histogram Interpretation," *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 11, no. 9, pp. OE01–OE04, Sep. 2017.
- [91] G. Banfi, G. L. Salvagno, and G. Lippi, "The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes," *Clin Chem Lab Med*, vol. 45, no. 5, pp. 565–576, 2007.
- [92] P. H. da Silva, H. B. Alves, S. R. Comar, R. Henneberg, J. C. Merlin, and S. T. Stinghen, "Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos," in *Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos*, Artmed, 2016, pp. 17–40.
- [93] J. Walters and P. Garrity, "Performance Evaluation of the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer," *Lab. Hematol.*, vol. 6, pp. 83–92, 2000.
- [94] Sysmex Corporation, *Analisador de Hematologia Automatizado XT-2000i/XT-1800i - Instruções de Utilização*. Sysmex Corporation, 2015.
- [95] K. M. McKinnon, "Flow Cytometry: An Overview," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 120, pp. 5.1.1–5.1.11, Feb. 2018.
- [96] K. Langford, L. Luchtman-Jones, R. Miller, and D. Walck, "Performance evaluation of the Sysmex XT-2000i automated hematology analyzer," *Lab. Hematol.*, vol. 9, no. 1, pp. 29–37, 2003.
- [97] S. Buoro et al., "Evaluation of nucleated red blood cell count by Sysmex XE-2100 in patients with thalassaemia or sickle cell anaemia and in neonates," *Blood Transfus.*, vol. 13, no. 4, pp. 588–594, Oct. 2015.
- [98] A. V. Hoffbrand and P. A. H. Moss, "Haemolytic anaemias," in *Essential Haematology*, 6th ed., Blackwell, 2011, pp. 74–87.
- [99] B. J. Bain, "Alterações quantitativas das células sanguíneas," in *Células sanguíneas: um guia prático*, 4th ed., Artmed, 2007, pp. 229–274.
- [100] A. V. Hoffbrand and P. A. H. Moss, "Erythropoiesis and general aspects of anaemia," in *Essential Haematology*, 6th ed., Wiley Blackwell, 2011, pp. 19–29.
- [101] B. J. Bain, "Técnica de Contagem de Glóbulos," in *Células sanguíneas: um guia prático*, 4th

ed., Artmed, 2007, pp. 32–72.

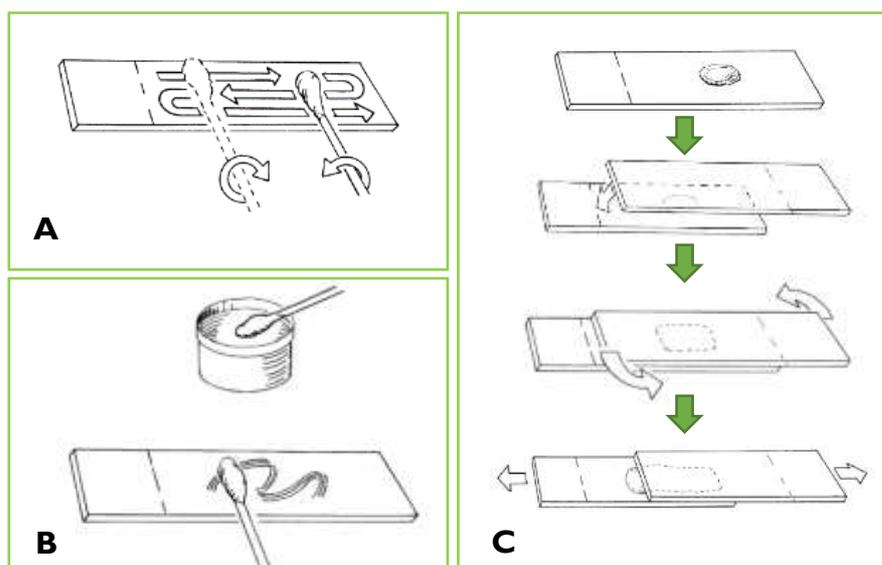
- [102] C. Briggs and B. J. Bain, “Basic haematological techniques,” in *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th ed., Elsevier Churchill Livingstone, 2011, pp. 24–41.
- [103] J. E. May, M. B. Marques, V. V. B. Reddy, and R. Gangaraju, “Three neglected numbers in the CBC: The RDW, MPV, and NRBC count,” *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 86, no. 3, pp. 167–172, Mar. 2019.
- [104] R. S. Riley, J. M. Ben-Ezra, R. Goel, and A. Tidwell, “Reticulocytes and reticulocyte enumeration,” *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 15, no. 5, pp. 267–294, 2001.
- [105] I. Bates and B. J. Bain, “Approach to the diagnosis and classification of blood diseases,” in *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th ed., Elsevier, 2011, pp. 549–559.
- [106] M. Koupenova, L. Clancy, H. A. Corkrey, and J. E. Freedman, “Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis,” *Circ. Res.*, vol. 122, no. 2, pp. 337–351, Jan. 2018.
- [107] B. J. Bain, “Morfologia das Células Sanguíneas,” in *Células sanguíneas: um guia prático*, 4th ed., Artmed, 2007, pp. 73–186.
- [108] B. J. Bain, “Blood cell morphology in health and disease,” in *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th ed., Elsevier, 2011, pp. 70–97.
- [109] A. V. Hoffbrand, P. Vyas, E. Campo, T. Haferlach, and K. Gomez, “Erythropoiesis and examination of the peripheral blood and bone marrow,” in *Color Atlas of Clinical Hematology Molecular and Cellular Basis of Disease*, 5th ed., Wiley Blackwell, 2019, pp. 47–52.
- [110] A. V. Hoffbrand, P. Vyas, E. Campo, T. Haferlach, and K. Gomez, “Megaloblastic anemias,” in *Atlas of clinical hematology Molecular and Cellular Basis of Disease*, 5th ed., Wiley Blackwell, 2019, pp. 76–86.
- [111] M. Nagler, P. Keller, D. Siegrist, and L. Alberio, “A case of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: simple recognition of an underdiagnosed and misleading phenomenon,” *BMC Clin. Pathol.*, vol. 14, no. 19, 2014.
- [112] A. V. Hoffbrand, P. Vyas, E. Campo, T. Haferlach, and K. Gomez, “Benign Disorders of Phagocytes,” in *Color Atlas of Clinical Hematology: Molecular and Cellular Basis of Disease*, 5th ed., Wiley Blackwell, 2019, p. 133.
- [113] M. Laffan and R. Manning, “Investigation of haemostasis,” in *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 11th ed., Elsevier, 2011, pp. 394–442.
- [114] V. L. Ng, “Prothrombin Time and Partial Thromboplastin Time Assay Considerations,” *Clin. Lab. Med.*, vol. 29, no. 2, pp. 253–263, Jun. 2009.
- [115] M. J. Kovacs et al., “Assessment of the validity of the INR system for patients with liver

- impairment,” *Thromb. Haemost.*, vol. 71, no. 6, pp. 727–730, Jun. 1994.
- [116] E. J. Favalaro, G. Kershaw, S. Mohammed, and G. Lippi, “How to Optimize Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Testing: Solutions to Establishing and Verifying Normal Reference Intervals and Assessing APTT Reagents for Sensitivity to Heparin, Lupus Anticoagulant, and Clotting Factors,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 45, no. 1, pp. 22–35, 2019.
- [117] M. A. Taye, “Sedimentation rate of erythrocyte from physics prospective,” *Eur. Phys. J. E*, vol. 43, no. 19, 2020.
- [118] I. Lapić *et al.*, “Ves-Matic CUBE 200: is modified Westergren method for erythrocyte sedimentation rate a valid alternative to the gold standard?,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 72, no. 10, pp. 716–719, Oct. 2019.
- [119] D. B. Sacks, M. B., C. B., and F. R. C. Path, “Diabetes,” in *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 7th ed., Elsevier, 2015, pp. 625–626.
- [120] W. G. John *et al.*, “Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1c analyser,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 53, no. 2, pp. 319–327, 2015.
- [121] C. R. Mahon, “Microscopic Examination of Materials from Infected Sites,” in *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 127–132.
- [122] A. C. Smith and M. A. Hussey, “Gram Stain Protocols,” *Am. Soc. Microbiol.*, 2005.
- [123] M. L. Bayot, T. M. Mirza, and S. Sharma, “Acid Fast Bacteria,” *StatPearls*, Aug. 2021.
- [124] B. J. Bain, “Coleta e distensão de sangue para exame,” in *Células sanguíneas: um guia prático*, 4th ed., Artmed, 2007, pp. 13–31.



## 9. Anexos

### 9.1. Anexo I: Técnicas utilizadas para a realização do esfregaço bacteriano



**Figura 15:** Diferentes técnicas utilizadas no CMLGS em Viseu para a obtenção do esfregaço bacteriano. **A-** Técnica utilizada para amostras biológicas obtidas através de zaragatoa. **B-** Técnica utilizada para amostras líquidas, semi-sólidas e suspensões bacterianas realizadas através dos produtos biológicos. **C-** Técnica utilizada para amostras espessas, granulares ou mucoides (Figuras adaptadas de [121]).

### 9.2. Anexo II: Meios Utilizados em Microbiologia no CMLGS em Viseu

**Tabela XIV:** Meios líquidos e sólidos disponíveis para o exame cultural no CMLGS em Viseu (Adaptado de [54]).

Meios Líquidos	
Caldo Coração-Cérebro (BHI-T)	Meio de enriquecimento; Adequado para o exame cultural de microrganismos não fastidiosos e moderadamente fastidiosos; Crescimento de microrganismos aeróbios exigentes.
Caldo Selenito-F (Selenito F-T)	Meio de enriquecimento; Adequado para a recuperação de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> em amostras de fezes ou outras amostras, com uma flora polimicrobiana associada; Selenito de sódio presente no meio, inibe o crescimento de bacilos Gram negativos e <i>Enterococcus</i> do microbioma.
Caldo Todd-Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)	Meio seletivo; Permite o isolamento de <i>Streptococcus</i> do Grupo B de esfregaços vaginais e retais; Este caldo possui peptonas, coração de boi e glicose; Contém antibióticos de modo a inibir o crescimento de bacilos Gram Negativos.
Meios Sólidos	
Gelose de Chocolate Haemophilus 2 (HAE2)	Meio Seletivo para isolamento das espécies do género <i>Haemophilus</i> em amostras com flora polimicrobiana; Esta gelose de sangue de ovelha possui o fator X (hemoglobina) e o fator V (NAD- nicotinamida adenina dinucleotide).
Gelose de Chapman	Meio seletivo e diferencial;

**Tabela XIV (Continuação):** Meios líquidos e sólidos disponíveis para o exame cultural no CMLGS em Viseu. (Adaptado de [54]).

<b>(MSA2)</b>	Permite o crescimento e a identificação de <i>Staphylococcus</i> de amostras com uma microbiota mista; O <i>Staphylococcus aureus</i> fermenta o manitol, produzindo ácidos, que diminuem o pH do meio e alteram a cor do indicador de pH de vermelho fenol para amarelo, ao contrário do que acontece com outras espécies de <i>Staphylococcus</i> .
Gelose Hektoen <b>(HEKT)</b>	Isolamento seletivo de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> em amostras clínicas (fezes).
Gelose Colombia ANC+ 5% Sangue de Carneiro <b>(CNA)</b>	Isolamento seletivo de bactérias exigentes. Detecção de hemólise. Permite o crescimento de bactérias Gram positivo em amostras clínicas.
Gelose de MacConkey <b>(MCK)</b>	Meio seletivo e diferencial; Permite o isolamento de <i>Enterobacteriaceae</i> ( <i>E.coli</i> ) e alguns bacilos Gram Negativo; Possui sais biliares e violeta cristal que inibem as bactérias Gram positivas.
Meio Löwenstein-Jensen <b>(LJ-T)</b>	Meio seletivo permite o isolamento do género <i>Mycobacterium</i> spp.; Este meio é constituído por farinha de batata, ovo, glicerol e aspargina; Inclui verde malaquita, que inibe o crescimento de outras bactérias presentes nas amostras.
<b>Meios Sólidos</b>	
Gelose de Chocolate Polyvitex <b>(VCA3)</b>	Meio seletivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> .
Gelose de Chocolate Polyvitex <b>(PVX)</b>	Meio para isolamento de bactérias exigentes; Meio para isolamento de <i>Neisseria</i> spp..
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 <b>(SGC2)</b>	Isolamento de leveduras e fungos a partir de amostras polimicrobiana.
Gelose de Colombia + 5% de Sangue de Carneiro <b>(COS)</b>	Isolamento de bactérias exigentes. Detecção de hemólise.
Gelose ChromID CPS Elite <b>(CPSE)</b>	Isolamento, contagem e identificação direta ou presuntiva de organismos infecciosos no trato urinário.
Gelose Campylosel <b>(CAM)</b>	O ágar sangue <i>Campylobacter</i> é um meio de enriquecimento seletivo para o isolamento e cultivo de <i>Campylobacter</i> spp. de amostras de fezes.
Gelose ChromID Strep B <b>(STRPB)</b>	Meio cromogénico deteção dos <i>Streptococcus</i> do grupo B em grávidas.

### 9.3. Anexo III: Coloração de Gram

**Figura 16:** Procedimento da coloração de Gram realizada no CMLGS em Viseu através de reagentes da casa comercial bioMérieux (Procedimento adaptado do protocolo [122]).

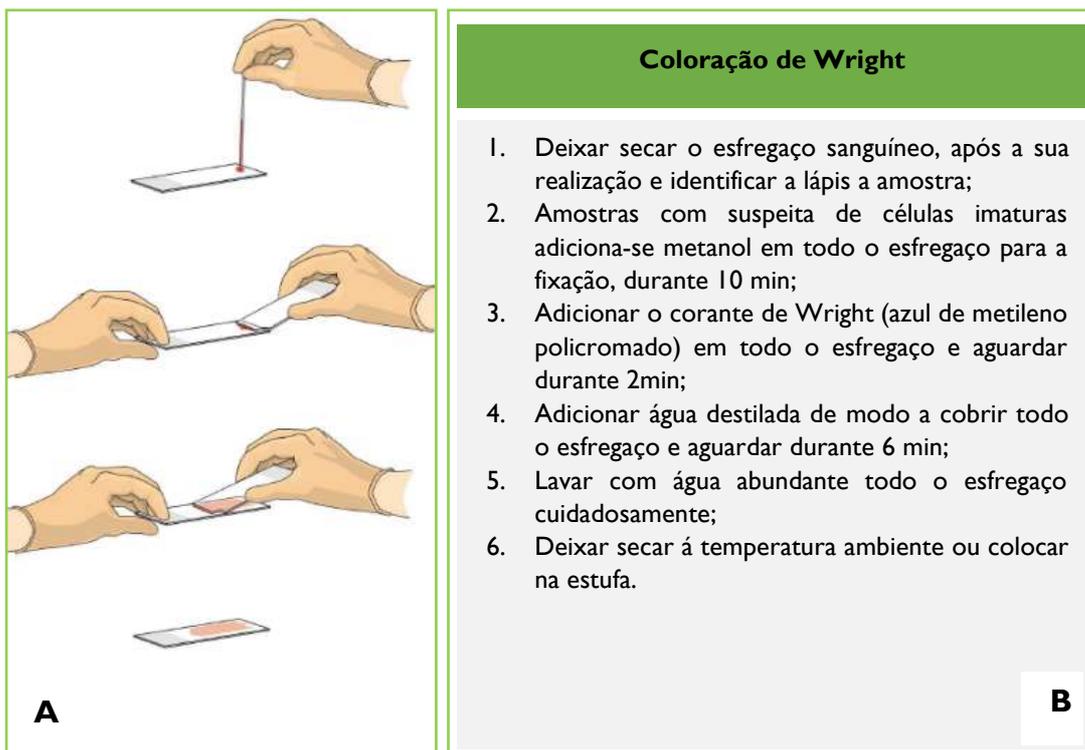
Coloração de Gram
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Executar o esfregaço bacteriano com a técnica mais adequada, deixar secar e realizar a fixação;</li><li>2. Cobrir na totalidade a lâmina com <b>Violeta de Cristal</b> e aguarda-se 30 segundos;</li><li>3. Lavar cuidadosamente com água;</li><li>4. Cobrir a lâmina com <b>Soluto de Lugol</b> e deixar atuar durante 30 segundos;</li><li>5. Lavar a lâmina com água;</li><li>6. Adicionar gota a gota <b>Álcool-Acetona</b>, até descorar o esfregaço;</li><li>7. Lavar com água e retirar o excesso;</li><li>8. Cobrir a lâmina com <b>Safranina</b>, durante 10 segundos;</li><li>9. Lavar com água;</li><li>10. Deixar a lâmina secar à temperatura ambiente ou colocar na estufa.</li></ol>

### 9.4. Anexo IV: Coloração de Ziehl-Neelsen

**Figura 17:** Procedimento laboratorial da coloração de Ziehl-Neelsen no CMLGS em Viseu (Protocolo adaptado de [123]).

Coloração de Ziehl-Neelsen
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Executar o esfregaço bacteriano com a técnica mais adequada, deixar secar e realizar a fixação;</li><li>2. Cobrir o esfregaço com <b>Carbolfuchsin</b>, e aquecer o esfregaço durante 10 min em chama (até surgir vapor), cuidadosamente sem ferver o corante;</li><li>3. Lavar cuidadosamente o esfregaço com água, retirando o excesso;</li><li>4. Cobrir o esfregaço com <b>álcool e ácido</b> por 2-3 minutos;</li><li>5. Lavar com água delicadamente;</li><li>6. Cobrir o esfregaço com <b>Azul de Metileno</b>, aguardar cerca de 1 min;</li><li>7. Lavar com água;</li><li>8. Deixar secar á temperatura ambiente ou na estufa.</li></ol>

## 9.5. Anexo V: Esfregaço de Sangue periférico e coloração de Wright



**Figura 18:** Procedimento da realização de esfregaços sanguíneos e coloração de Wright no CMLGS em Viseu (Figura e protocolo adaptado de [124]).

## **Capítulo II**

“Antibiotic pattern of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in urine samples”



## List of Abbreviations

---

- AES:** Advanced Expert System
- CDC:** Centers for Disease Control and Prevention
- CFU:** Colony-forming unit
- EAU:** European Association of Urology
- ECDC:** European Centre for Disease Prevention and Control
- ESBL:** extended-spectrum  $\beta$ -lactamases
- EUCAST:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- ExPEC:** Extraintestinal *Escherichia coli*
- MDR:** Multidrug-Resistance
- MIC:** Minimum inhibitory concentration
- SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences
- TMP-SMZ:** Trimethoprim/Sulfamethoxazole
- UPEC:** Uropathogenic *Escherichia coli*
- UTI:** Urinary tract infections



## Abstract

---

Urinary tract infections (UTIs) are the most frequent bacterial infections with a higher incidence in women and represents one of the major causes of hospitalization in the older age and the most frequent cause of antibiotic prescriptions worldwide. *Escherichia coli* is responsible for most community-acquired and hospital-acquired UTIs. Antibiotic resistance is a global concern particularly in *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases associated with multidrug-resistance (MDR) strains, treatment failure and increased mortality rate.

In this retrospective study, 1431 *Escherichia coli* strains were isolated and 54 (3.8%) of these isolates were extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) producers. Positive urines with *E. coli* non ESBL isolates show a higher incidence in female individuals (87.2%) and a high prevalence in the 68-84 age group (29.8%). ESBL-producing *E. coli* strains presented a higher prevalence in females (85.2%) and high incidence at age over 68 years (72.2%). ESBL-producing strains show high resistance to most of the antibiotics tested and are mostly MDR (98.1%). On the other hand, non-ESBL *E. coli* strains showed susceptibility to the most of antibiotics tested and 17.5% of these isolates were identified as MDR.

Diagnosis of the agent causing UTIs and susceptibility testing are essential for a more targeted antibiotic therapy and to decrease the use of empiric therapies related to increased antibiotic resistance of microorganisms.

**Keywords:** Urinary Tract Infections, *Escherichia coli*, Antibiotic Resistance, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, Multidrug-resistance.



## Resumo

---

As infecções do trato urinário (ITUs) são as infecções bacterianas mais frequentes com uma maior incidência em mulheres e uma das principais causas de hospitalização em idosos e de prescrição de antibióticos em todo o mundo. *Escherichia coli* é a bactéria responsável pela maioria das infecções urinárias adquiridas na comunidade e infecções nosocomiais. O uso excessivo de antibióticos na prática clínica e o tratamento empírico inadequado, proporciona um aumento de estirpes resistentes a antibióticos, particularmente, *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL) que estão frequentemente associadas a multirresistência, a falhas no tratamento e no aumento da taxa de mortalidade.

Neste estudo retrospectivo verificou-se o isolamento de 1431 estirpes de *Escherichia coli* e 54 (3,8%) destes isolados são produtores de ESBL. As urinas positivas com isolados de *E. coli* não produtores de ESBL apresentam uma maior incidência em indivíduos do sexo feminino (87,2%) e maior prevalência na faixa etária de 68-84 anos (29,8%). As estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL apresentam igualmente uma maior prevalência em indivíduos do sexo feminino (85,2%) e é evidente uma maior prevalência em idades superiores a 68 anos (72,2%). As estirpes produtoras de ESBL demonstram elevada resistência á maioria dos antibióticos testados e 98,1% destes isolados revelaram ser MDR. Por outro lado, as estirpes não produtoras de ESBL demonstraram sensibilidade á maioria dos antibióticos testados e cerca de 17,5% foram identificadas como multirresistentes.

O diagnóstico do agente causador de ITUs e os testes de suscetibilidade são essenciais para uma antibioterapia mais direcionada, diminuindo o uso de terapias empíricas, muitas vezes relacionadas com o aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos.

**Palavras-chave:** Infecções do trato urinário, *Escherichia coli*, Resistência a antibióticos,  $\beta$ -lactamases de espectro-alargado, Multirresistência.



## I. Introduction

---

Urinary tract infections are the most common community-acquired and nosocomial infections, with an incidence at all ages [1,2,3]. In addition, these infections are the most common cause of hospitalization in the old age and account for the majority of antibiotic prescriptions around the world [1].

These infections can affect the lower urinary tract (cystitis) and the upper urinary tract (pyelonephritis) in severe situations [4]. UTIs can be classified as uncomplicated or complicated, this differentiation is important for the choice of therapy because complicated infections have a higher risk of treatment failure [5]. Uncomplicated UTIs usually occur in healthy individuals without structural or anatomical abnormalities in the urinary tract. There are some risk factors associated with these infections such as gender, history of UTIs, sexual activity, vaginal infections, diabetes, obesity, and genetic susceptibility. Complicated urinary tract infections are generally associated with structural abnormalities of the urinary tract, immunocompromised individuals, medical instrumentation and pregnancy [4].

The diagnosis of UTIs should be made through the analysis of the information obtained from urine culture, urinalysis and symptoms [6]. The interpretation of these parameters is essential for a correct diagnosis of UTI because sometimes asymptomatic bacteriuria may be present in the urine and although it may increase the risk of UTI, it should not be treated in healthy individuals [2].

The choice of antibiotic therapy for UTIs should take into account the etiological agent and its local susceptibility profiles [3]. The European Association of Urology (EAU) recommends based on European susceptibility standards, the antibiotics: fosfomicin trometamol, nitrofurantoin, pivmecillinam, trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMZ) for the empirical first-line treatment of uncomplicated cystitis of pre-menopausal women and uncomplicated pyelonephritis. TMP-SMZ and fluoroquinolones are recommended for the empiric treatment of uncomplicated UTIs in men. As a second-line treatment of uncomplicated cystitis fluoroquinolones and the  $\beta$ -lactams can be used [7,8].

UTIs may have several etiological agents, but the microorganism responsible for most infections is *Escherichia coli* [9]. *E. coli* is a Gram negative, facultative anaerobic bacteria that is commensal to the human gastrointestinal tract and one of the most frequently isolated human pathogen in clinical microbiology laboratories [2,10]. Generally, *E. coli* strains able of causing infection in the urinary tract are extraintestinal (ExPEC), uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and differ from commensal strains because they encode several virulence factors that allow colonization in the urinary tract [11,12]. Presumably the more frequent form of transmission

of UPEC occurs through the movement of the bacteria from the gastrointestinal to the bladder, but it can also occur by sexual transmission [2].

Antibiotic resistance is a global concern as it is associated with a higher morbidity, mortality, and increased healthcare costs. Antibiotic resistance has increased over the years due to a selective pressure promoted by the excessive use of antibiotics in hospitals, nursing homes and in the environment, which contribute to the selection and dissemination of resistant strains. In addition to these factors, in the context of urinary tract infections, the prescription of antibiotics in asymptomatic bacteriuria, along with the use of empirical therapies that are inappropriate to the microorganism, and the prophylactic use of antibiotics in recurrent UTIs, contribute to this selective pressure and an increase in the selection of resistant strains [3, 9, 13,14].

The emerging resistance of *Enterobacteriaceae*, including *Escherichia coli* is a global concern that requires attention, especially to those strains able of producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). ESBLs are  $\beta$ -lactamase enzymes that hydrolyse antibiotics of several classes such as penicillins, first-, second-, and third-generation cephalosporins, and aztreonam, conferring resistance to these antibiotics. These enzymes are not able to hydrolyse antibiotics of the carbapenem or cephamycins class and are inhibited by  $\beta$ -lactamase inhibitors such as clavulanic acid. The presence of ESBL-producing *Escherichia coli* strains limits treatment because most of these strains are multidrug-resistant (MDR) and are therefore related to an increased mortality rate [15,16].

The aim of this study is to characterize the antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated in urine samples, observe the prevalence of ESBL-producing strains and multidrug-resistant strains.

## 2. Materials and Methods

---

### 2.1. Sampling collection

This study was a retrospective analysis of bacteriological data from the laboratory Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa on Hospital CUF in Viseu between 9 January 2020 and 25 June 2021. Information about positive urine cultures of *Escherichia coli* such as age and gender of the patient, presence of ESBLs, antibacterial susceptibility tests and the place of sample acquisition were collected. The study sample included 1431 positive urine cultures obtained in outpatient setting and from hospital samples (emergency, inpatient and other healthcare-associated samples).

## 2.2. Microbiological analysis

Proper urine sample was inoculated in ChromID CPS Elite chromogenic medium (bioMérieux), which makes the presumptive identification of the most frequent bacteria that can cause urinary infections, particularly *Escherichia coli* [17]. The plate was incubated at 37°C for 18/24 hours.

The evaluation of urine cultures was based on the colony count obtained in culture, the purity of the culture, the leukocyte count in the urinary sediment and the associated symptoms [6]. Urine cultures with pure *Escherichia coli* colonies (pink colonies) and more than  $10^5$  CFU/mL, obtained from patients with the presence of leukocytes and/or with associated symptoms, were selected for this study. Pure cultures with a count  $\geq 10^3$  CFU/mL were also included if leukocytes and symptomology were present.

Bacterial identification of positive cultures was performed by inoculating pure culture bacteria in 2.5 mL of a 0.45% sodium chloride solution, adjusted to a 0.5 McFarland density, according to the manufacturer's instruction. Bacterial identification was based on the biochemical and metabolic profile of the bacteria by the automated system VITEK<sup>®</sup> 2 COMPACT using GN card (bioMérieux).

## 2.3. Susceptibility patterns

Antibacterial susceptibility testing was performed by the VITEK<sup>®</sup> 2 COMPACT automated system using AST-359 and AST-355 cards. For this study, the following antibiotics were tested: Ampicillin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Cefuroxime, Cefotaxime, Ceftazidime, Cefepime, Ertapenem, Meropenem, Gentamicin, Ciprofloxacin, Fosfomicin, Nitrofurantoin and Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

The antibacterial susceptibility tests were performed by inoculating pure culture bacteria in 2.5 mL of a 0.45% sodium chloride solution, adjusted to a 0.5 McFarland density and subsequently diluting the bacterial suspension according to the manufacturer's instructions (bioMérieux) [18]. The isolated microorganisms were classified as resistant, susceptible, and intermediate to each of the antibiotics tested based on the standardized norms established by EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

The detection of ESBL producing strains was performed by the equipment. The detection of ESBL production occurs by determining susceptibility of Cefepime, Cefotaxime and Ceftazidime with and without the presence of Clavulanic Acid. Subsequently, the MIC patterns were analyzed with the Advanced Expert System (AES) software. [19].

## 2.4. Determination of multidrug-resistant strains

The determination of multidrug-resistant strains (MDR) was obtained through the analysis of the samples. The isolates were classified as MDR according to the definition described by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MDR is defined by acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories [20].

## 2.5. Statistical analysis

The bacteriological data were organized using Microsoft Office Excel. For statistical treatment of the data, the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) program was used.

# 3. Results

---

## 3.1. Demographic characteristics

The demographic data of the samples are represented in **Table I**. During the study period, *Escherichia coli* isolates (n=1431) belonged mostly to female urine samples with a prevalence of 87.1% (n=1247).

Age was recorded for the 1431 individuals with *Escherichia coli* isolate and a median age (years) of 61 years (51-67 years) was observed. The minimum age recorded is 2 months while the maximum age recorded is 100 years. The age group between 68 and 84 years was that with a higher incidence of *Escherichia coli* isolates with 30.1% (n=431), followed by the group between 51 and 67 years with 23.4% (n=335). Higher predominance of *E. coli* isolates was observed in females at all ages. Most samples were obtained in the outpatient setting (78.7%), followed by samples obtained in the CUF Hospital emergency department (19.8%).

## 3.2. *Escherichia coli* isolates characteristics

Fifty-four (3.8%) out of the 1431 *E. coli* isolates were identified as *Escherichia coli* strains producing ESBLs. The age groups with a higher incidence of ESBL-producing strains are 68-84 years (38.9%), followed by 85-101 years (33.3%). These two age groups comprise 72.2% of the samples with ESBL-producing *E. coli* isolates. In addition, there is a predominance of ESBL *E. coli* in samples from females (85.2%). The isolates were mostly obtained from outpatient samples (81.5%), samples obtained in the CUF Hospital emergency department (11.1%) (**Table I**).

Non-ESBL *E. coli* samples were isolated in 1377 urine samples with a predominance of female samples (87.2%) and higher incidence in the age group 68-84 years (29.8%). Most

samples of non-ESBL-producing *Escherichia coli* isolates were obtained in outpatient settings (78.6%), followed by samples obtained in the CUF Hospital emergency department (20.2%) (Table I).

**Table I:** Demographics characteristics of patients with positive urine samples.

Demographics	Total (n=1431)	<i>E.coli</i> (n=1377)	<i>E.coli</i> ESBL (n=54)
Age (years), median (IQR)	61	61	62
Age Group, n (%)			
0- 16 years	63 (4.4)	62 (4.5)	1 (2.0)
17-33 years	139 (9.7)	137 (10)	2 (3.7)
34-50 years	315 (22.0)	310 (22.5)	5 (9.3)
51-67 years	335 (23.4)	328 (23.8)	7 (13)
68-84 years	431 (30.1)	410 (29.8)	21 (38.9)
85-101 years	148 (10.3)	130 (9.4)	18 (33.3)
Sex, n (%)			
Male	184 (12.8)	176 (12.8)	8 (14.8)
Female	1247 (87.1)	1201 (87.2)	46 (85.2)
Place of acquisition n (%)			
Outpatient	1126 (78.7)	1082 (78.6)	44 (81.5)
Inpatient	14 (1.0)	12 (0.9)	2 (3.7)
Healthcare-associated	7 (0.5)	5 (0.4)	2 (3.7)
Emergency	284 (19.8)	278 (20.2)	6 (11.1)

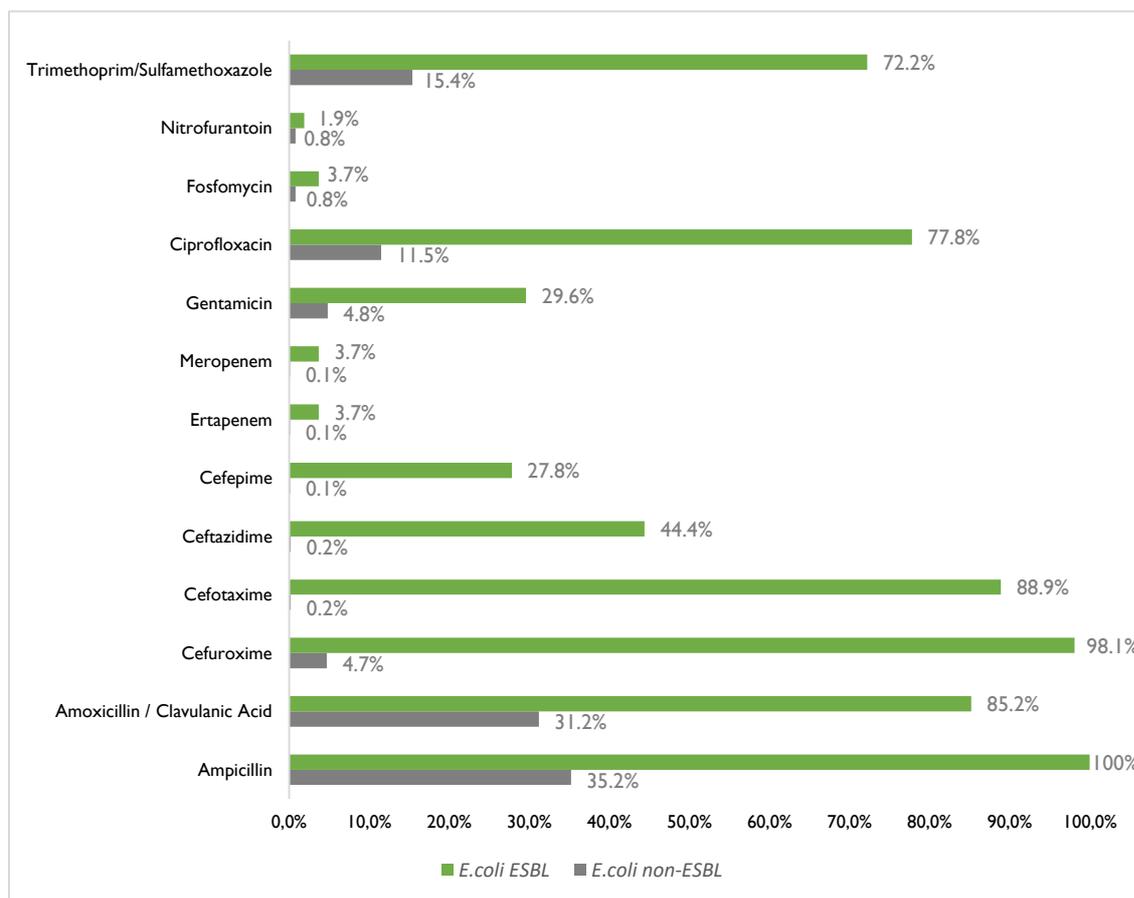
n, number of samples; IQR, interquartile range; ESBL, extended-spectrum beta-lactamase.

### 3.3. Antibiotic pattern

Antibacterial susceptibility test was performed on 1428 samples of *Escherichia coli* isolates. The rate resistance of the isolates to the antibiotics tested is described in **Figure I**. *E. coli* ESBL isolates showed high resistance rates to Penicillin class with 100% resistance to Ampicillin and 85.2% to Amoxicillin/Clavulanic acid. These isolates have a high percentage of resistance to second- and third- generation Cephalosporins with a resistance rate of 98.1% to Cefuroxime and 88.9% to Cefotaxime. The resistance rate to Ceftazidime 44.4% and Cefepime (27.8%) is lower than the others Cephalosporins tested. Trimethoprim/Sulfamethoxazole (72.2%) and Ciprofloxacin (77.8%) show high resistance rates. However, these isolates have low resistance rate to Carbapenems (3.7%), Nitrofurantoin (1.9%), Fosfomicin (3.7%), Gentamicin (29.6%).

Non-ESBL *Escherichia coli* isolates showed a low resistance to Carbapenems (0.1%), Fosfomicin (0.8%), Nitrofurantoin (0.8%) and Gentamicin (4.8%). These isolates have low resistance to the several tested Cefolosporins: Cefuroxime (4.7%), Cefotaxime (0.2%), Ceftazidime (0.2%), Cefepime (0.1%).

The highest resistance rates of non-ESBL *Escherichia coli* isolates were in the Penicillin class with 31.2% and 35.2% for Amoxicillin/Clavulanic Acid and Ampicillin, respectively. Resistance to Trimethoprim/Sulfamethoxazole was observed in 15.4% of the non-ESBL isolates, and Ciprofloxacin resistance in 11.5% of those isolates.



**Figure 1:** Percentage of isolates resistant to the antibiotics tested.

### 3.4. Multidrug-resistant bacteria

Urine samples (n=1428) were submitted to an evaluation for MDR determination, the results obtained are represented in **Table II**. In this study, 294 MDR isolates (20.6%) were identified, with a higher prevalence of these microorganisms in females (85.7%), and in the age groups of 51-67 years (22.1%) and 68-84 years (34.7 %). These isolates were obtained in outpatient (79.3%) and emergency (17.3%).

From a sample of *Escherichia coli* non ESBL (n=1374), were identified 241 multidrug-resistant isolates (17.5%) with a higher prevalence in females and mostly at the age groups 51-67 years (24.1%) and 68-84 years (34.0%). Most isolates were obtained from urine samples in outpatient (78.8%).

Of the total *E. coli* ESBL isolates (n=54) under study, 98.1% were classified as MDR (n=53), with a higher incidence in females (84.9%) and a higher prevalence in individuals age  $\geq$  68 years (71.7%).

**Table II:** Demographic characteristics of patients with MDR isolates in urine samples.

MDR	Total (n= 294)	<i>E.coli</i> (n=241)	<i>E.coli</i> ESBL (n=53)
Age Group, n (%)			
0- 16 years	11 (3.7)	10 (4.1)	1 (1.9)
17-33 years	23 (7.8)	21 (8.7)	2 (3.8)
34-50 years	45 (15.3)	40 (16.6)	5 (9.4)
51-67 years	65 (22.1)	58 (24.1)	7 (13.2)
68-84 years	102 (34.7)	82 (34.0)	20 (37.7)
85-101 years	48 (16.3)	30 (12.4)	18 (34.0)
Sex, n (%)			
Male	42 (14.3)	34 (14.1)	8 (15.1)
Female	252 (85.7)	207 (85.9)	45 (84.9)
Source of sample, n (%)			
Outpatient	233 (79.3)	190 (78.8)	43 (81.1)
Emergency	51 (17.3)	45 (18.7)	6 (11.3)
Healthcare-associated	5 (1.7)	3 (1.2)	2 (3.8)
Inpatient	5 (1.7)	3 (1.2)	2 (3.8)

#### 4. Discussion and conclusions

In this retrospective study, most of the positive urine culture samples with *Escherichia coli* isolates belong to women with a prevalence of 87.1% (n=1431), as found in previous studies [21,22]. Women have a higher predisposition for UTIs due to anatomical features, sexual activity, pregnancy, menopause and history of UTIs [23]. On the other hand, a higher incidence of positive urine cultures was observed in individuals among the 68-84 age group in *E. coli* ESBL (38.9%) and *E. coli* non-ESBL (29.8%). Age represents a risk factor for UTIs due to an increased rate of urinary retention, menopause, changes in immunity and associated comorbidities that increase the risk of hospitalization and invasive procedures such as urinary catheterization [13,24]. *E. coli* positive urine cultures (n=1431) are mostly from outpatient source (78.7%), a fact that can be due to the high flow of samples in this setting compared to hospital source in the studied period.

In this study the prevalence of *E. coli* ESBL isolated from urine was 3.8% (n=54), a lower prevalence than that observed in a similar study using European data with a prevalence of 17.9% of *E. coli* ESBL strains [25]. Most isolates in this study, were obtained from urine samples from individuals older than 68 years (72.2%), with a mean age of 62 years. Previous epidemiological studies show that there are certain risk factors associated with colonization by ESBL-producing *E. coli*, such as age  $\geq$  65 years, recent antibiotic treatment, hospitalizations, comorbidities, immobilization, nursing homes, history of UTIs and travel to places with a higher prevalence of this strains [26, 27].

In the present study, an evaluation of the susceptibility patterns to several classes of antibiotics in non-ESBL isolates and ESBL isolates was performed. According to the EAU the first-line antibiotics for the treatment of uncomplicated cystitis are nitrofurantoin and fosfomicin [8]. These antibiotics are recommended for their low resistance rates and because of their good activity levels against *E. coli* and some *Enterobacteriaceae* bacteria [3]. The resistant non-ESBL *E.coli* isolates are lower (0.8%) compared to data from a 2016 study of several countries in Europe where <1.5% of isolates were resistant to the two antibiotics tested [28]. ESBL *E. coli* strains show a percentage of resistance to fosfomicin and nitrofurantoin of 3.7% and 1.9% respectively. Similar studies in Switzerland found that 1.4% of the ESBL *E. coli* isolates were resistant to fosfomicin, which is less than that reported in this study [29]. TMP/SMX is prescribed as first-line treatment for uncomplicated cystitis according to the EAU and should be used only in areas with a low incidence of resistant *E. coli* strains (<20%) [7,8]. In this study, 72.2% of ESBL *E. coli* isolates and 15.4% of non-ESBL *E. coli* isolates were resistant to TMP/SMX, respectively. Infections with ESBL *E. coli* isolates should not be treated empirically with this antibiotic, according to the data. A comparative study performed in Korea demonstrates the high resistance of ESBL *E.coli* to TMP/SMX (54%)[30].

Fluroquinolones are recommended as second-line treatment in uncomplicated cystitis and pyelonephritis according to EAU [3]. The percentage of fluroquinolones resistant *E. coli* isolates in Portugal in 2020 was 23.9%, according to data provided by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)[31]. Ciprofloxacin was the most prescribed fluroquinolone antibiotic for the treatment of UTIs [3]. In the region under study the prevalence of resistant isolates in non-ESBL strains (11.5%) is lower than the prevalence of resistance in Portugal, contrary to the ESBL *E. coli* isolates that showed a high resistance (77.8%) to ciprofloxacin. A retrospective study in Brasilia between 2013 and 2014 in a tertiary hospital reported that 18.8% of *Escherichia coli* isolates from outpatient samples were resistant to ciprofloxacin, above the results obtained in this study for non-ESBL producing *E. coli*. [32]. On the other hand, a study conducted in Korea on *E.coli* urine isolates producing ESBL showed that 68% of the isolates were resistant to ciprofloxacin, which is lower than the values observed in this study [30]. Ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid are used in the treatment of uncomplicated cystitis only if first-line antibiotics cannot be used due to the high resistance of microorganisms worldwide to these two antibiotics [33]. The results obtained in this study found that both strains showed high rates of resistance to these two antibiotics and therefore should not be prescribed for empirical treatment [3]. In this current study, it was found that 100% and 85.2% of ESBL *E. coli* were resistant to ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid respectively. Non-ESBL *E. coli* isolates were 35.2% and 31.2% resistant to ampicillin and

amoxicillin/clavulanic acid, respectively. Despite these results, *E. coli* non-ESBL demonstrated a lower incidence of isolates resistant to these two antibiotics tested compared to the incidence of aminopenicillin resistant isolates observed in Portugal (54.4%) during the 2020, according to the ECDC data [31].

Third-generation cephalosporins have a prevalence of resistance of 14.4% in Portugal in 2020, according to the ECDC report [31]. UTIs treatment guidelines recommend the administration of first and second generation cephalosporins only when the resistance rate is <10% [33]. In this study isolates were tested for susceptibility to 2nd generation cephalosporins (cefuroxime), 3rd generation cephalosporins (cefotaxime, ceftazidime) and 4th generation cephalosporins (cefepime). Non-ESBL *E. coli* isolates showed low prevalence of resistance to the antibiotics tested (<10%). In contrast, ESBL-producing isolates showed high rates of resistance to cefuroxime (98.1%), cefotaxime (88.9%), ceftazidime (44.4%). The prevalence of resistance to ceftazidime and cefotaxime is higher than that observed in Portugal for 3rd generation cephalosporins. This high prevalence of resistance is explained by the fact that certain ESBL strains acquire plasmids that give them resistance to antibiotics, namely 3rd generation cephalosporins [34]. Carbapenems are last line antibiotics and are used for the treatment of  $\beta$ -lactamase producing strains. In this study ESBL *E. coli* (3.7%) and non-ESBL *E. coli* (0.1%) isolates show low resistance rates, although the first ones showed a higher prevalence than the observed in Portugal (0.2%) in 2020, according to the ECDC report [31]. A study conducted in northern India with ESBL strains isolated from urine from outpatient samples showed that 97% had carbapenemases genes, which is problematic because these strains could be resistant to most of the available antibiotics [35]. Finally, *E. coli* ESBL in this study exhibited a high rate of gentamicin resistance (29.6%), compared to the aminoglycoside resistance rates in Portugal in 2020 (11.7%), according to the ECDC report [31].

In this study, most isolates of ESBL-producing *E. coli* are multidrug-resistant (98.1%). These isolates were mostly obtained in urine from individuals aged over 68 years (71.7%). A study conducted between 2017-2019 in Turkey revealed that age over 65 years is a risk factor for colonization of MDR species [36]. On the opposite, *E. coli* non ESBL-producing isolates show a lower incidence of multidrug-resistance (17.5%) and higher prevalence in urine samples from individuals in age groups 51-84 years (58.1%).

UTIs caused by MDR bacteria have been increasing over the years leading to increased morbidity, mortalities and costs associated with these infections [36]. A similar study published in 2012, conducted in several European countries, revealed a prevalence of MDR *E. coli* isolates in the Netherlands, Germany, and Belgium of 11%, 17% and 27%, respectively. The results obtained in the present study revealed a higher rate of MDR *E. coli* isolates (20.6%) compared to that obtained in Germany and the Netherlands, however with a lower prevalence than that obtained in Belgium [37].

This retrospective study has some limitations such as: limited access to clinical history, symptoms, associated comorbidities of the individuals and the impossibility to confirm ESBL strains with another methodology, as described in the literature [26,29].

In future studies it would be useful to know the risk factors of patients with *E. coli* ESBL isolates and to perform molecular studies to characterize the  $\beta$ -lactamases of *E. coli* strains to know the mechanisms of resistance in the region.

In conclusion, antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* is a problematic issue triggered by overuse of antibiotics, inappropriate choice of antibiotic, prophylactic antibiotic therapy in recurrent UTIs. Therefore, it is essential to investigate the resistance patterns of strains causing UTIs, their resistance genes and virulence factors for the development of new therapeutic and prophylactic strategies.

## 5. Bibliography

---

- [1] A. Masajtis-Zagajewska and M. Nowicki, "New markers of urinary tract infection," *Clin. Chim. Acta*, vol. 471, pp. 286–291, Aug. 2017.
- [2] B. Foxman, "The epidemiology of urinary tract infection," *Nat. Rev. Urol.*, vol. 7, no. 12, pp. 653–660, Dec. 2010.
- [3] B. Kot, "Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*," *Polish J. Microbiol.*, vol. 68, no. 4, pp. 403–415, Dec. 2019.
- [4] A. L. Flores-Mireles, J. N. Walker, M. Caparon, and S. J. Hultgren, "Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 5, pp. 269–284, Mai. 2015.
- [5] S. E. Geerlings, "Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections," *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 5, Oct. 2016.
- [6] G. Reid, "Urinary Tract Infections," in *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Elsevier, 2015, pp. 884–900.
- [7] R. Bartoletti, T. Cai, F. M. Wagenlehner, K. Naber, and T. E. Bjerklund Johansen, "Treatment of Urinary Tract Infections and Antibiotic Stewardship," *Eur. Urol. Suppl.*, vol. 15, no. 4, pp. 81–87, Jul. 2016.
- [8] M. Grabe *et al.*, "Guidelines on Urological Infections," *Eur. Assoc. Urol.*, pp. 13–20, Mar. 2015.
- [9] A. Moura, A. Nicolau, T. Hooton, and J. Azeredo, "Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, no. 6, pp. 1779–1791, Jun. 2009.
- [10] J. Vila *et al.*, "*Escherichia coli*: an old friend with new tidings," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 40, no. 4, pp. 437–463, Jul. 2016.
- [11] J. Bien, O. Sokolova, and P. Bozko, "Role of uropathogenic *escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage," *Int. J. Nephrol.*, vol. 2012, Mar. 2012.
- [12] S. Subashchandrabose and H. L. T. Mobley, "Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*," *Microbiol. Spectr.*, vol. 3, no. 4, Aug. 2015.
- [13] N. W. Cortes-Penfield, B. W. Trautner, and R. L. P. Jump, "Urinary Tract Infection and Asymptomatic Bacteriuria in Older Adults," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 4, pp. 673-688, Dec. 2017.
- [14] V. P. O'Brien, T. J. Hannan, H. V. Nielsen, and S. J. Hultgren, "Drug and Vaccine Development for the Treatment and Prevention of Urinary Tract Infections," *Microbiol.*

*Spectr.*, vol. 4, no. 1, Feb. 2016.

- [15] D. L. Paterson and R. A. Bonomo, "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A clinical update," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 657–686, Oct. 2005.
- [16] D. L. Paterson, "Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae," *Am. J. Med.*, vol. 119, no. 6 Suppl 1, pp. S20-8; discussion S62-70, Jun. 2006.
- [17] J. D. Perry, "A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 449–479, Apr. 2017.
- [18] G. Funke, D. Monnet, C. DeBernardis, A. Von Graevenitz, and J. Freney, "Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 7, pp. 1948–52, 1998.
- [19] T. Spanu *et al.*, "Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 9, pp. 3257–3262, Sep. 2006.
- [20] A. P. Magiorakos *et al.*, "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, no. 3, pp. 268–81, Mar. 2012.
- [21] T. Costa, I. Linhares, R. Ferreira, J. Neves, and A. Almeida, "Frequency and Antibiotic Resistance of Bacteria Implicated in Community Urinary Tract Infections in North Aveiro Between 2011 and 2014," *Microb. Drug Resist.*, vol. 24, no. 4, pp. 493–504, May 2018.
- [22] R. Passadouro, R. Fonseca, F. Figueiredo, A. Lopes, and C. Fernandes, "Evaluation of the Antimicrobial Susceptibility of Community-Acquired Urinary Tract Infection," *Acta Med. Port.*, vol. 27, no. 6, pp. 737–42, Dec. 2014.
- [23] A. Guglietta, "Recurrent urinary tract infections in women: risk factors, etiology, pathogenesis and prophylaxis," *Future Microbiol.*, vol. 12, pp. 239–246, Mar. 2017.
- [24] T. A. Rowe and M. Juthani-Mehta, "Diagnosis and Management of Urinary Tract Infection in Older Adults," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 28, no. 1, pp. 75-89, Mar. 2014.
- [25] I. A. Critchley, N. Cotroneo, M. J. Pucci, A. Jain, and R. E. Mendes, "Resistance among urinary tract pathogens collected in Europe during 2018," *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 23, pp. 439–444, 2020.
- [26] A. Blom, J. Ahl, F. Månsson, F. Resman, and J. Tham, "The prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in a nursing home setting compared with elderly living at home: A cross-sectional comparison," *BMC Infect. Dis.*, vol. 16, no. 111, Mar. 2016.
- [27] F. B. Hertz *et al.*, "Epidemiological factors associated with ESBL- and non ESBL-

- producing *E. coli* causing urinary tract infection in general practice,” *Infect. Dis.*, vol. 48, no. 3, pp. 241–5, 2016.
- [28] M. Kresken *et al.*, “Comparative in vitro activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 22, no. 1, pp. 63.e1-63.e5, Jan. 2016.
- [29] L. Mueller, C. Cimen, L. Poirel, M.-C. Descombes, and P. Nordmann, “Prevalence of fosfomicin resistance among ESBL-producing *Escherichia coli* isolates in the community, Switzerland,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 5, pp. 945–949, 2019.
- [30] H. Lee, S. B. Han, J. H. Kim, S. Kang, and A. Durey, “Risk factors of urinary tract infection caused by extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in emergency department,” *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 36, no. 9, pp. 1608–1612, Sep. 2018.
- [31] European Centre For Disease Prevention and Control and World Health Organization regional office for Europe, “Antimicrobial resistance surveillance in Europe,” 2022. Available: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>. [Accessed: 26-Jan-2022].
- [32] R. C. R. M. da Silva *et al.*, “Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil,” *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 9, pp. 61–67, 2017.
- [33] K. Gupta *et al.*, “International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 52, no. 5, pp. e103–e120, Mar. 2011.
- [34] R. Pandit, B. Awal, S. S. Shrestha, G. Joshi, B. P. Rijal, and N. P. Parajuli, “Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Genotypes among Multidrug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Isolates from a Teaching Hospital of Nepal,” *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, vol. 2020, no. 6525826, Apr. 2020.
- [35] V. R. Gajamer *et al.*, “High prevalence of carbapenemase, AmpC  $\beta$ -lactamase and aminoglycoside resistance genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive uropathogens from Northern India,” *J. Glob. Antimicrob. Resist.* vol. 20, pp. 197203, Mar. 2020.
- [36] E. Guclu, F. Halis, E. Kose, A. Ogutlu, and O. Karabay, “Risk factors of multidrug-resistant bacteria in community-acquired urinary tract infections,” *Afr. Health Sci.*, vol. 21, no. 1, pp. 214–219, Mar. 2021.

- [37] C. F. M. van der Donk et al., “Antimicrobial Resistance and Spread of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* Isolates Collected from Nine Urology Services in the Euregion Meuse-Rhine,” PLoS One, vol. 7, no. 10, p. e47707, Oct. 2012.