

**Relatório de Estágio no Laboratório de
Patologia Clínica do Centro Hospitalar
Tondela-Viseu
Versão final após defesa**

Joana Alexandra Cabral Carreira

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

Orientador: Dra. Ana Maria Torres Simões
Co-orientador: Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

dezembro de 2022

Declaração de Integridade

Eu, Joana Alexandra Cabral Carreira, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10945 de Bioquímica da Faculdade Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

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

Universidade da Beira Interior, Covilhã 03/10 /2022



(Joana Alexandra Cabral Carreira)

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Ana Simões, quero agradecer por toda a ajuda, por todos os conselhos, pela paciência e por todo o tempo dedicado a este projeto.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Cândida Tomaz, tenho a agradecer a disponibilidade e apoio prestado durante a preparação deste relatório.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital de São Teotónio, em especial ao Dr. Jorge Loureiro, por me ter permitido realizar este estágio e por toda a atenção.

À Rita, pela excelente amizade e companheirismo ao longo destes anos todos.

À Soraia e à Françoise por serem como família e estarem sempre ao meu lado para me apoiar em tudo.

Ao Rafael, por sempre me dar força e motivação.

À minha família, em especial aos meus pais, por todos os incentivos, amor e apoio incondicional que permitiram que esta experiência fosse possível.

Resumo

Um laboratório clínico é um local específico para análise de produtos provenientes do corpo humano, com o propósito de fornecer informações para o diagnóstico, prevenção ou tratamento de qualquer doença. A bioquímica é elementar para a prática da medicina clínica e um dos objetivos de qualquer laboratório é assegurar que esses dados estejam disponíveis e que sejam obtidos eficientemente. O presente relatório retrata a passagem nos diferentes setores do laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela-Viseu, focando mais os setores de microbiologia e hematologia.

Novos fatores de resistência aparecem regularmente e as populações bacterianas resistentes espalham-se quando os antibióticos exercem pressões seletivas que favorecem a resistência. Os antibióticos podem eliminar populações microbianas suscetíveis, reduzindo a competição e expandindo os recursos disponíveis para bactérias resistentes. A bactéria *Escherichia coli* tem um lugar especial no mundo microbiológico, pois pode causar infecções graves em humanos e animais, mas também representa uma parte significativa da microbiota autóctone dos diferentes hospedeiros. Um dos antibióticos usados no tratamento é a fosfomicina pois interfere na síntese da parede celular, bloqueando a primeira etapa da síntese do peptidoglicano. O principal objetivo deste projeto de investigação foi avaliar a utilidade do sistema comercial automatizado de microdiluição em caldo – VITEK® 2 em estudos de rotina de modo a detetar a suscetibilidade de *E. coli* à fosfomicina, comparando-a com o método de difusão em disco, designado como método de Kirby-Bauer. Apesar do pequeno número de isolados resistentes, pode verificar-se que os resultados apresentados pelo VITEK® 2 e os resultados obtidos pelo método da difusão em disco não constituíram matéria de discordância durante o estudo, demonstrando assim a possibilidade de se adotar em rotina apenas o método automático para o estudo de fosfomicina em infecções por *E. coli*.

Palavras-chave

Microbiologia; Hematologia; *Escherichia coli*; fosfomicina; resistência; VITEK® 2; difusão em disco.

Abstract

A clinical laboratory is a specific place for analyzing products from the human body in order to provide information for the diagnosis, prevention or treatment of any disease. Biochemistry is elemental to the practice of clinical medicine, and one of the goals of any laboratory is to ensure that this data is available and that it is obtained efficiently. This report portrays the passage in the different sectors of the Clinical Pathology laboratory of Centro Hospitalar Tondela-Viseu, focusing more on the microbiology and hematology sectors.

New resistance factors appear regularly, and resistant bacterial populations spread when antibiotics exert selective pressures that favor resistance. Antibiotics can eliminate susceptible microbial populations, reducing competition and expanding the resources available to resistant bacteria. The bacterium *Escherichia coli* has a special place in the microbiological world, as it can cause serious infections in humans and animals, but also represents a significant part of the indigenous microbiota of different hosts. One of the antibiotics used for treatment is fosfomicin because it interferes with cell wall synthesis by blocking the first step of peptidoglycan synthesis., The main objective of this research project was to evaluate the usefulness of the commercial automated broth microdilution system – VITEK® 2 in routine studies to detect the susceptibility of *E. coli* to fosfomicin, comparing it with the disk diffusion method, referred to as the Kirby-Bauer method. Despite the small number of resistant isolates, it can be verified that the results presented by the VITEK® 2 and the results obtained by the disk diffusion method showed agreement during the study, thus demonstrating the possibility of routinely adopting only the automated method for the study of fosfomicin in *E. coli* infections.

Keywords

Microbiology; Hematology; *Escherichia coli*; fosfomicin; resistance; VITEK® 2; disk diffusion

Índice

Capítulo 1: Relatório de Estágio.....	1
1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório de Patologia Clínica	2
3. Procedimento Analítico.....	3
3.1 Fase pré analítica	3
3.2 Fase analítica.....	4
3.3 Fase pós analítica	4
4. Controlo de Qualidade	5
4.1 Controlo de Qualidade Interno	6
4.2 Avaliação Externa da Qualidade	8
4.3 Manutenções.....	8
4.4 Calibrações	9
4.5 Acreditação e Certificação	9
5. Sala de colheitas	10
5.1 Colheitas de Sangue.....	10
5.1.1 Tubos utilizados e respetivos anticoagulantes.....	11
5.1.2 Interferentes.....	14
5.1.2.1 Hemólise	14
5.1.2.2 Icterícia	14
5.1.2.3 Lipemia	15
5.2 Provas funcionais efetuadas na sala de colheitas.....	15
6. Laboratório de Microbiologia	16
6.1 Meios de Cultura	16
6.2 Análise microscópica	20
6.2.1 Coloração de Gram.....	21
6.2.2 Coloração de Ziehl-Neelsen.....	22
6.3 Técnicas de sementeira em meios sólidos	22
6.4 Testes auxiliares à identificação de microrganismos.....	23
6.4.1 Teste da catalase	23
6.4.2 Teste da oxidase	23
6.4.3 Teste da coagulase	24
6.4.4 Teste do indol	24

6.4.5	Teste da urease	25
6.4.6	Teste da optoquina.....	25
6.4.7	API®	25
6.4.8	Pesquisa de antígenos de Lancefield.....	26
6.4.9	VITEK® 2	26
6.4.10	Teste de sensibilidade aos antibióticos manual com discos e E-Test.....	28
6.5	Produtos Biológicos.....	29
6.5.1	Hemoculturas.....	29
6.5.2	Cateteres	32
6.5.3	Urinas.....	32
6.5.4	Fezes.....	34
6.5.4.1	Outros testes efetuados nas fezes.....	37
6.5.5	Aparelho genital	38
6.5.6	Esperma.....	41
6.5.7	Pus/Exsudado purulento	41
6.5.8	Tecidos/Biópsias	42
6.5.9	Bilis.....	42
6.5.10	Exsudado Nasal e Axilar.....	43
6.5.11	Exsudado Vaginal e/ou Retal (grávidas)	43
6.5.12	Líquidos estéreis.....	44
6.5.12.1	Líquido Cefalorraquidiano	44
6.5.13	Aparelho respiratório.....	46
6.5.13.1	Expetoração	48
6.5.13.2	Aspirado Brônquico	49
6.5.13.3	Lavado Brônquico	49
7.	Laboratório de Serologia.....	50
8.	Laboratório de Hematologia	53
8.1	Hematopoiese.....	53
8.2	Hemograma	55
8.2.1	Eritrograma.....	57
8.2.1.1	Eritrócitos	57
8.2.1.2	Hemoglobina	58
8.2.1.3	Hematócrito	58

8.2.1.4 Índices Hematimétricos	58
8.2.1.5 RDW	59
8.2.1.6 Reticulócitos	60
8.2.2 Leucograma	60
8.2.2.1 Leucócitos.....	60
8.2.2.2 Neutrófilos.....	61
8.2.2.3 Linfócitos	61
8.2.2.4 Monócitos	62
8.2.2.5 Eosinófilos	62
8.2.2.6 Basófilos.....	63
8.2.3 Plaquetograma	64
8.2.3.1 Plaquetas	64
8.2.3.2 MPV	65
8.2.3.3 PDW.....	65
8.2.4 Execução e observação de esfregaços de sangue periférico	66
8.3 Velocidade de Sedimentação Eritrocitária	67
8.4 Hemóstase.....	68
8.5 Coagulação	69
8.5.1 Estudo da Hemóstase	70
8.5.2 Estudos de coagulação	71
8.5.3 Tempo de Protrombina	72
8.5.4 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada.....	73
8.5.5 Fibrinogénio.....	73
8.5.6 D-Dímeros.....	73
8.5.7 Estudo da Trombofilia.....	74
8.5.7.1 Antitrombina.....	74
8.5.7.2 Proteína C.....	74
8.5.7.3 Proteína S.....	74
8.5.8 Anticoagulante Lúpico	75
8.5.9 Fator de Von Willebrand.....	76
8.6 Citometria de Fluxo	76
9. Laboratório de Bioquímica.....	78
10. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular.....	80
10.1 Imunologia.....	80

10.2 Biologia Molecular	80
11. Conclusão	82
Capítulo 2: Projeto de Investigação.....	83
1. Introdução	83
1.1 Resistência aos antimicrobianos	83
1.2 <i>Escherichia coli</i>	84
1.2.1 <i>E coli</i> infecciosa	84
1.2.2 Mecanismos de toxicidade	85
1.2.2.1 Toxina Shiga	85
1.2.2.2 Elementos Genéticos	86
1.2.2.3 Biofilmes	86
1.3 Fosfomicina	86
1.3.1 Mecanismo de ação	88
1.3.2 Mecanismos de resistência	88
1.3.3 Sinergia com outros antibióticos	89
1.3.4 Método de difusão em disco (método de Kirby Bauer).....	89
2. Objetivos do Projeto de Investigação	90
3. Material e métodos.....	91
3.1 Recolha de dados	91
3.2 Processamento das amostras.....	91
3.3 Análise Estatística	92
4. Resultados	93
5. Discussão de Resultados	97
6. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	98
Bibliografia	99
Anexos	107

Lista de Figuras

Figura 1: Gráficos do Unity efetuados no laboratório de bioquímica do CHTV, de modo a poder avaliar o estado do controlo de qualidade interno e as suas tendências (neste caso o analito tem dois níveis de controlo).	7
Figura 2: Veias do antebraço, representado o local mais adequado para realizar colheita de sangue ¹⁴⁸	11
Figura 3: Diferença entre uma bactéria Gram positiva e uma Gram negativa. Imagem adaptada de ¹⁴⁹	21
Figura 4: (A) Cocos Gram positivos e (B) Bacilos Gram negativos. Imagens obtidas do laboratório de microbiologia do CHTV.	21
Figura 5: Imagem microscópica de B.A.A.R com coloração de Ziehl-Neelsen. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.	22
Figura 6: Técnicas de sementeira em meios sólidos. (A)- Técnica por quadrantes, figura adaptada de ³¹ e (B)-Técnica para análise semi-quantitativa de urinas, figura adaptada de ¹⁵⁰	23
Figura 7: Sistema de identificação API®. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.	25
Figura 8: Sistema automatizado VITEK® 2. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.	26
Figura 9: Cartas de Identificação usadas no Vitek 2 ¹⁵¹	27
Figura 10: Carta de antibiograma usada no Vitek 2 ¹⁵²	27
Figura 11: E-Test ¹⁵³	29
Figura 12: Modo de funcionamento do BACTEC 9240 ¹⁵⁴	30
Figura 13: Garrafas de hemocultura disponíveis no CHTV.	31
Figura 14: Teste <i>C. difficile</i> Quik Chek Complete®. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.	36
Figura 15: CerTest® Rotavirus+Adenovirus Combo Card Test. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.	37
Figura 16: Figura representativa da Hematopoiese ⁷⁸ . Baso: basófilo; BFU: unidade formadora explosiva; CFU: unidade formadora de colónia; E: eritroide; Eo: eosinófila; GEMM: granulocítica, eritroide, monocítica e megacariocítica; GM: granulócito, monócito; Meg: megacariócito; NK: <i>natural killer</i>	54

Figura 17: Analisador hematológico DxH 600 (Beckman Coulter) utilizado no laboratório de hematologia do CHTV.	56
Figura 18: Gráfico representativo de uma distribuição celular normal, exibida pelo aparelho Beckman Coulter DxH 600.....	56
Figura 19: Eritrócitos visualizados ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.....	57
Figura 20: Exemplo de um neutrófilo observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.....	61
Figura 21: Exemplo de um linfócito observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.	62
Figura 22: Exemplo de um monócito observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.	62
Figura 23: Exemplo de um eosinófilo observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.	63
Figura 24: Exemplo de um basófilo observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.	64
Figura 25: Procedimento na preparação de um esfregaço de sangue periférico ⁷⁸ . 66	
Figura 26: ALIFAX Test 1 BCL. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.	68
Figura 27: Figura representativa da cascata de coagulação sanguínea ⁷⁸	70
Figura 28: Aparelho ACL TOP 700 (IL) utilizado no laboratório de hematologia do CHTV.	71

Lista de Tabelas

Tabela 1: Regras de Westgard ⁹	6
Tabela 2: Caracterização dos tubos utilizados na sala de colheitas do CHTV ¹⁸	11
Tabela 3: Descrição dos meios de cultura utilizados ^{25,26}	17
Tabela 4: Densidade ótica, conforme a escala de MacFarland, das suspensões necessárias para a realização de identificações ou antibiogramas.	28
Tabela 5: Garrafas de hemocultura utilizadas no laboratório de microbiologia ^{38,40}	30
Tabela 6: Microrganismos a considerar no caso de infecção ou excluir no caso de contaminação ³⁸	31
Tabela 7: Leitura do número de colónias convertido em UFC.	33
Tabela 8: Meios utilizados na cultura de fezes ²⁵	34
Tabela 9: Valorização de resultados na cultura de produtos provenientes do aparelho genital feminino.....	40
Tabela 10: Valorização de resultados na cultura de produtos provenientes do aparelho genital masculino.	40
Tabela 11: Microrganismos a considerar no LCR, conforme a idade.	45
Tabela 12: Modo de colheita dos diferentes produtos do aparelho respiratório.	46
Tabela 13: Classificação das amostras de expetoração, segundo o critério de Murray e Washington.	49
Tabela 14: Tabela com exemplos de plaquetas observadas ao microscópio. Imagens obtidas do CHTV.....	65
Tabela 15: Número e respetivo nome dos fatores presentes na cascata de coagulação.....	72
Tabela 16: Parâmetros avaliados no laboratório de química analítica do CHTV. ...	78
Tabela 17: Aparelho e respetivos parâmetros efetuados nos laboratórios de Imunologia e Biologia Molecular.....	80
Tabela 18: Caracterização das amostras estudadas em função do produto, meio semeado e mês de estudo.	93
Tabela 19: Caracterização dos lotes dos meios, discos e cartas utilizados no estudo das amostras.....	94

Tabela 20: Caracterização das amostras estudadas em função do mês da colheita.	95
Tabela 21: Estudo da concordância dos métodos em estudo.	96

Lista de Acrónimos

AEQ	Avaliação da Qualidade Externa
AI	Substância Autoindutora
AL	Anticoagulante Lúpico
ALT	Alanina aminotransferase
ANA	Anticorpos anti-nucleares
ANCA	Anticorpo anti-citoplasmático de neutrófilo
APC	Proteína C ativada
APCER	Associação Portuguesa de Certificação
aPL	Anticorpos antifosfolípidos
APS	Síndrome antifosfolípidos
APTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
ASCA	Anticorpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
AT	Antitrombina
B.A.A.R.	Bacilo álcool-ácido resistente
BK	Bacilo de Koch
BNP	Péptido Natriurético tipo B
CCP	Péptido Citrulinado Cíclico
CF	Citometria de Fluxo
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CHTV	Centro Hospitalar Tondela-Viseu
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CK-MB	Creatina Quinase-MB
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMV	Citomegalovírus
CQ	Controlo de Qualidade
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CVC	Cateter Venoso Central
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
dRVVT	Veneno de Víbora de Russell diluído
DvW	Doença de von Willebrand

EAggEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EBV	Vírus Epstein–Barr
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
ENA	Anticorpos Dirigidos Contra Antígenos Extraíveis Nucleares
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogénica
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
ESBL	β -lactamases de espectro alargado
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Fc	Fragmento Cristalizável
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
G6P	Glucose-6-Fosfato
GDH	Glutamato Desidrogenase
GlpT	Transportador de Glicerol-3-Fosfato
Hb	Hemoglobina
HBV	Vírus da Hepatite B
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hct	Hematócrito
HCV	Vírus da Hepatite C
HCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSC	Célula-tronco Hematopoiética
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ITU	Infeção do Trato Urinário
K ₃ EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDH	Lactato Desidrogenase
LH	Hormona luteinizante
MDR	<i>Multi Drug Resistant</i>
MEP	Progenitor Megacariócito Eritroide
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>

MPV	Volume Plaquetar Médio
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina
MurA	Enzima UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferase
NAAT	Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NSE	Enolase Neuroespecífica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Proteína C
PDW	Amplitude de anisocitose Plaquetar
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PS	Proteína S
PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
PTH	Paratormona
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RDW	Amplitude da Variação do Volume dos Eritrócitos
RE	Retículo Endoplasmático
RGP	Sistema de Identificação Rápido para Gram positivos
RNA	Ácido Ribonucleico
RPR	Teste Rápido da Reagina Plasmática
RSV	Vírus Sincicial Respiratório
SCT	<i>Silica Clotting Time</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STEC	<i>E. coli</i> produtora de Toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TB	Tuberculose
TF	Fator Tecidular
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro à Transferrina
TP	Tempo de Protrombina
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
TSDT	Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica
TSH	Hormona Estimulante da Tireoide
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UhpT	Transportador de Glicose-6-Fosfato
UPEC	<i>E coli</i> Uropatogénica
VCM	Volume Corpuscular Médio

Vd/F	Volume Aparente de Distribuição
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VF	Fator de Virulência
VS	Velocidade de Sedimentação Eritrocitária
VTEC	Vero <i>E. coli</i> produtora de citotoxina
vWF	Fator de von Willebrand

Capítulo 1: Relatório de Estágio

1. Introdução

Um laboratório clínico é um local específico para análise de produtos provenientes do corpo humano, com o propósito de fornecer informações para o diagnóstico, prevenção ou tratamento de qualquer doença, ou para a avaliação da saúde dos seres humanos ¹.

Os laboratórios clínicos são um elemento fundamental de qualquer sistema de saúde, pois as decisões tomadas sobre os doentes pelos médicos dependem principalmente dos resultados fornecidos pelos laboratórios. Os resultados laboratoriais influenciam cerca de 70% a 75% do diagnóstico médico ², pelo que a qualidade do serviço laboratorial afeta diretamente a qualidade da assistência à saúde. Os resultados laboratoriais necessitam ser tão precisos e exatos quanto possível e, ao mesmo tempo, os métodos laboratoriais devem ser confiáveis com relatórios adequados para serem úteis em ambiente clínico ³.

A bioquímica é elementar para a prática da medicina clínica. As bases bioquímicas de muitas doenças são conhecidas há muito tempo, e a investigação nesta área fornece cada vez mais informação sobre os mecanismos moleculares subjacentes aos processos patológicos. Um dos objetivos de qualquer laboratório é assegurar que esses dados estejam disponíveis e que sejam obtidos eficientemente. Para isso, cada etapa do processo, deverá ser devidamente controlada, desde o pedido do estudo, à colheita das amostras necessárias, o seu transporte até o laboratório e análise até à entrega do relatório ao médico ⁴.

Ao longo do estágio tive a oportunidade de seguir toda a rotina diária de um laboratório hospitalar, acompanhando todo o processamento laboratorial desde a fase pré-analítica, até à analítica e pós-analítica. O estágio teve a duração de 1200 horas, com início a 6 de setembro de 2021 e término a 29 de abril de 2022.

Numa primeira fase, o estágio consistiu na compreensão do funcionamento e organização do laboratório, com foco nos princípios básicos de segurança laboratorial, boas práticas laboratoriais e materiais necessários para a colheita de amostras. Numa segunda fase, presenciei todo o processo de colheitas de sangue realizadas nas respetivas salas deste hospital e acompanhei cada setor disponível no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela-Viseu (CHTV), incidindo principalmente nos setores de Microbiologia e Hematologia sendo, portanto, os temas mais aprofundados neste relatório.

2. Caracterização do Laboratório de Patologia Clínica

O Serviço de Patologia Clínica do CHTV inclui o laboratório localizado no Hospital de São Teotónio em Viseu e o laboratório do Hospital Cândido de Figueiredo localizado em Tondela. O objetivo do Serviço de Patologia Clínica do CHTV consiste na análise de amostras biológicas de doentes integrados na unidade hospitalar Tondela-Viseu de modo a assegurar a qualidade dos resultados dos exames laboratoriais, no mais curto tempo possível, de forma a auxiliar no diagnóstico das patologias dos doentes, nas áreas de Urgência, Microbiologia, Serologia, Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Biologia Molecular. O Serviço de Patologia Clínica, onde decorreu o presente estágio é dirigido pelo Dr. Jorge Loureiro e a equipa é composta por técnicos de diagnóstico e terapêutica, técnicos superiores, farmacêuticos, patologistas clínicos, assistentes técnicos e administrativos.

3. Procedimento Analítico

O diagnóstico laboratorial está dividido em três etapas, desde a solicitação dos exames, colheita e transporte de amostras biológicas (fase pré-analítica), análise das amostras biológicas (fase analítica) e exposição dos resultados e sua interpretação (fase pós-analítica). No entanto podem ainda ser diferenciadas em “pré-pré-” e “pós-pós-” para dividir alguns pontos que serão mencionadas em seguida.

As causas mais comuns de erros durante o diagnóstico laboratorial são ⁵:

1. Pré-pré-analítico (46-68%)

Solicitação de exames inadequados, entrada de pedido no sistema informático, identificação incorreta do doente/amostra, colheita de amostra (hemólise, coagulação, volume insuficiente etc.), recipiente, manipulação, armazenamento e transporte inadequados.

2. Pré-analítico (3-5%)

Identificação de amostra, perda, alíquotas, pipetagem, centrifugação (tempo e/ou velocidade).

3. Analítico (7-13%)

Mau funcionamento do equipamento, mistura de amostras, interferência (endógena ou exógena), falha não detetada no controlo de qualidade.

4. Pós-analítico (13-20%)

Validação inadequada de dados analíticos, falha no relatório, tempo de retorno excessivo, dados incorretos, erro de entrada e transcrição manual, falha/atraso no relatório com valores críticos.

5. Pós-pós-analítico (25-46%)

Interpretação incorreta, plano de acompanhamento inadequado, falha em solicitar consulta apropriada.

3.1 Fase pré analítica

A fase pré-analítica é a parte do processo analítico que compreende a colheita do material biológico e preparação do doente, armazenamento e transporte de amostras, preparação das amostras por centrifugação, congelamento e descongelamento, alíquotas, etc.

Nos últimos anos, a fase pré-analítica tornou-se cada vez mais importante na medicina laboratorial e vários estudos têm sido publicados sobre a possível fonte de erros representados pela colheita e armazenamento incorretos das amostras ⁶.

3.2 Fase analítica

A fase analítica, como o próprio nome indica, refere-se a todo o processo de análise do material biológico colhido. Inclui verificação dos equipamentos, tal como reagentes e condições de funcionamento, averiguação de controlos e calibrações e monitorização dos processos de análise.

3.3 Fase pós analítica

A fase pós-analítica é a fase final do trabalho laboratorial desde a avaliação de resultados até à sua divulgação. Envolve a análise dos resultados dos testes laboratoriais, validação em tempo útil, particularmente resultados críticos, e modificação, anotação ou revogação de resultados conforme necessário para apoiar a tomada de decisão clínica ⁷.

A frequência de erros laboratoriais durante a fase pós-analítica é menor do que a frequência de erros durante a fase pré-analítica, no entanto é responsável por quase 1/4 de todo o processo laboratorial ⁷.

4. Controlo de Qualidade

A finalidade de um exame laboratorial é fornecer informações úteis para a deteção, diagnóstico e monitorização da doença e para isso, deve garantir a qualidade do processo analítico com base em critérios bem definidos ⁸.

O objetivo de um teste do laboratório clínico é avaliar a condição fisiopatológica de cada doente, de modo a auxiliar o diagnóstico e/ou monitorizar a terapêutica. Para que um resultado de teste laboratorial seja válido para a tomada de decisão clínica, deve apresentar um erro total suficientemente insignificante que lhe permita refletir a situação biológica em estudo. O erro total de um resultado é influenciado pelos seguintes fatores ¹:

- variabilidade biológica/fisiológica do indivíduo;
- variabilidade pré-analítica na colheita, no transporte, no processamento e no armazenamento da amostra;
- variabilidade analítica do desempenho do teste;
- substâncias interferentes, como fármacos ou compostos metabólicos.

Um ponto importante na melhoria da qualidade analítica laboratorial é a definição de indicadores de *performance* que podem ser monitorizados como medidas de desempenho analítico laboratorial. Nesta era da medicina baseada em evidências, onde os testes laboratoriais são importantes para a tomada de decisões clínicas, as especificações de qualidade dos testes laboratoriais também têm de se basear em sólidas evidências científicas ⁸. Portanto, implementa-se um sistema de controlo de qualidade interno (CQI) que se usa para validar se o instrumento está a operar dentro das especificações predefinidas, inferindo que os resultados dos testes são confiáveis. Uma vez que o sistema de teste é validado, os resultados do doente podem ser usados para diagnóstico, prognóstico ou planeamento de tratamento. Os produtos de controlo devem ser sempre testados da mesma forma que as amostras dos doentes ⁹.

O controlo de qualidade (CQ) é um processo de amostragem estatística de um método qualitativo e quantitativo, com o intuito de verificar se este está a ser executado de acordo com as especificações pré-estabelecidas ¹.

Os valores-alvo de CQ e os limites de desempenho aceitáveis são instituídos para otimizar a probabilidade de detetar um erro quantitativo. O sistema quantitativo deve ser corretamente calibrado e operar dentro das especificações de desempenho aceitáveis, antes da determinação dos parâmetros estatísticos a serem empregues para estabelecer as regras interpretativas do CQ. Uma vez que o valor-alvo tenha sido atribuído a um dado material de CQ, deve ser estabelecido um desvio-padrão (DP) que represente a imprecisão típica do

método, quando este opera dentro de sua normalidade, ou seja, o DP é, um modo convencional de expressar a variabilidade do método ¹.

4.1 Controlo de Qualidade Interno

O CQI é um componente integral da estrutura geral de qualidade do laboratório para monitorizar o desempenho de sistemas analíticos. É realizado pela medição periódica de um analito(s) numa matriz estável com uma concentração de analito conhecida. As medições de CQI são geralmente compreendidas num gráfico de controlo de processo estatístico (também conhecido como gráfico de Levey-Jennings) e interpretadas contra limites de controlo predefinidos, usando diferentes regras de controlo de qualidade (regras de Westgard) ¹⁰.

As regras de Westgard foram desenvolvidas para expressar a probabilidade de uma regra interpretativa de CQ detetar um erro analítico. O modelo estatístico de Westgard considera que os erros seguem distribuições gaussianas (normais) e, embora existam distribuições não gaussianas de erros nos sistemas quantitativos, tem fornecido diretrizes úteis para selecionar as regras de interpretação dos resultados de CQ ¹.

Existem seis regras básicas no esquema de Westgard, descritas na Tabela 1. Essas regras são usadas individualmente ou em combinação para avaliar a qualidade das execuções analíticas. A violação de qualquer uma das regras não requer necessariamente a rejeição da execução analítica. Essas violações identificam erros sistemáticos menores ou tendência dos analitos que geralmente não são clinicamente significativos ou relevantes. Essas tendências podem ser eliminadas executando calibração ou manutenção do instrumento ⁹.

Tabela 1: Regras de Westgard ⁹.

Nome da Regra	Explicação
1 _{2s}	Esta é uma regra de aviso que é violada quando uma única observação de controlo está fora dos limites de $\pm 2DP$. Esta regra apenas adverte que erros aleatórios ou erros sistemáticos podem estar presentes no sistema de teste. Se nenhuma fonte de erro puder ser identificada, deve assumir-se que um único valor de controlo fora dos limites de $\pm 2DP$ é um erro aleatório aceitável.
1 _{3s}	Esta regra identifica erros aleatórios inaceitáveis ou possivelmente o início de um grande erro sistemático. Qualquer resultado de CQ fora de $\pm 3DP$ viola esta regra.
2 _{2s}	A regra é inicialmente aplicada para valores de 2 controlos (2 níveis). Os resultados não são libertados quando os valores de 2 controlos excedem os limites de $\pm 2DP$, no mesmo dia. A regra pode ser aplicada também em 2 observações consecutivas (2 dias) para um mesmo controlo. A violação indica um erro sistemático.
R _{4s}	Esta regra identifica apenas erros aleatórios e é aplicável somente quando há 2 níveis numa mesma corrida instalados. Se houver pelo menos uma diferença de $4DP$ entre os valores de controlo numa única execução, a regra será violada por erro aleatório.

3 _{is}	Os critérios que devem ser atendidos para violar esta regra são: três resultados consecutivos, maiores que 1DP, do mesmo lado da média. Indicam erros sistemáticos.
4 _{is}	Os critérios que devem ser atendidos para violar esta regra são: quatro resultados consecutivos, maiores que 1DP, do mesmo lado da média. Indicam erros sistemáticos.
7 \bar{x} , 8 \bar{x} , 9 \bar{x} , 10 \bar{x} , 12 \bar{x}	Estas regras são violadas quando há: 7, 8, 9, 10 ou 12 resultados de controlo no mesmo lado da média, independentemente do DP específico, em que estão localizados. Indicam erros sistemáticos.

A exatidão e a precisão são aspetos diferentes, mas fundamentais, que precisam de ser tidos em consideração quando se pretende avaliar a qualidade do resultado de uma medição. A precisão de uma série de medições é o grau da concordância entre determinações repetidas. A exatidão é tanto maior quanto menor for a distância entre a medida e um valor. A esta distância damos o nome de erro experimental ¹¹.

Existem duas contribuições principais para o erro experimental, uma sistemática e outra aleatória. Erros sistemáticos geralmente resultam em desvios sistemáticos (valores mais altos ou mais baixos) do valor que está a ser medido, resultando numa menor exatidão. São causados por má calibração dos instrumentos de medição, uso desses instrumentos em condições diferentes das recomendadas, leituras incorretas por parte dos observadores, etc. Já os erros aleatórios são causados por flutuações aleatórias observadas nos resultados obtidos de diferentes leituras e podem reduzir a precisão. Podem ser causados por falta de sensibilidade dos instrumentos ou do observador, leituras incorretas (mas não sistemáticas), vibrações, etc. ¹¹.

O CHTV utiliza um programa chamado Unity Real Time (Bio Rad Laboratories) que consiste num *software* que gere dados de controlo de qualidade. Essa tecnologia fornece revisão estatística e análise de todos os controlos usados no laboratório, possibilitando, ainda, a comparação interlaboratorial.

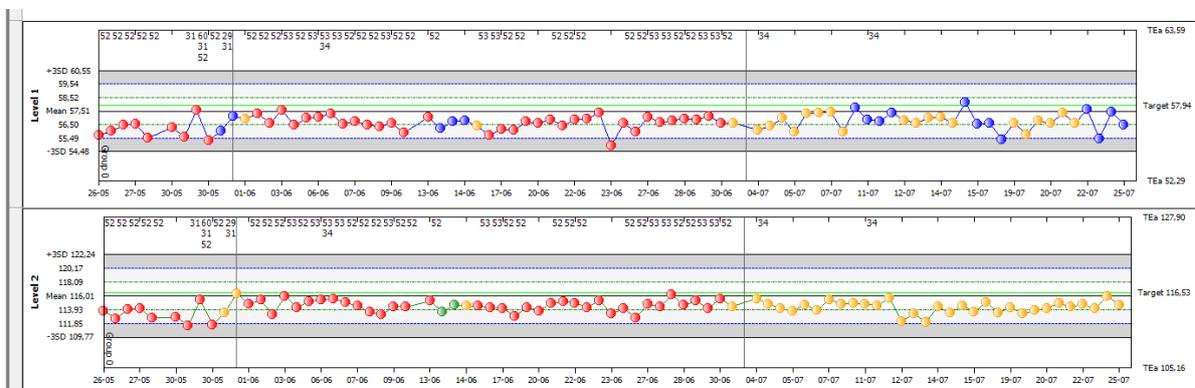


Figura 1: Gráficos do Unity efetuados no laboratório de bioquímica do CHTV, de modo a poder avaliar o estado do controlo de qualidade interno e as suas tendências (neste caso o analito tem dois níveis de controlo).

4.2 Avaliação Externa da Qualidade

Diretrizes clínicas baseadas em evidências mostram que pelo menos 80% das diretrizes que visam estabelecer um diagnóstico ou controlar a doença requerem testes laboratoriais. Os laboratórios estão cientes disso há muito tempo e tentam reduzir o risco de má interpretação dos resultados dos doentes testados em diferentes laboratórios. No entanto, esses conceitos devem ser construídos em sistemas bem projetados e implementados de CQ e Avaliação de Qualidade Externa (AEQ). Portanto, AEQ é um controlo interlaboratorial que tem como principal objetivo a avaliação dos resultados do laboratório por um Organismo Exterior de Qualidade. Compara a exatidão dos dados analíticos e desempenho do laboratório com o de outros laboratórios que utilizem os mesmos métodos a nível nacional e internacional ¹². AEQ tem como objetivos ¹³:

- Avaliar, monitorizar e comparar o desempenho dos laboratórios nas diferentes valências da sua atividade de forma independente;
- Identificar as diferenças interlaboratoriais;
- Harmonizar a metodologia utilizada nos laboratórios;
- Identificar situações não conformes, sugerir ações de melhoria e confirmar a eliminação de problemas;
- Calcular incertezas da medição;
- Validar novas metodologias;
- Qualificar colaboradores;
- Avaliar as necessidades de formação;
- Promover a confiança dos clientes do laboratório.

O CHTV participa no programa UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme).

4.3 Manutenções

Todos os dias antes de iniciar o trabalho, de modo a garantir o bom funcionamento do laboratório, fazem-se as devidas manutenções e/ou lavagens aos equipamentos, preparam-se os reagentes, verifica-se a necessidade de calibrar e passam-se controlos dos testes a usar naquele dia. O CHTV, através do seu programa informático *Modulab Gold* (Werfen), exporta os controlos efetuados nos equipamentos para o programa *Unity Real Time* (Bio Rad Laboratories) que serve como uma ferramenta para gerir dados de CQ, permitindo também comparação de resultados com outros laboratórios aderentes a este programa.

4.4 Calibrações

As atividades de calibração fazem parte da rotina dos laboratórios, sendo um pré-requisito para avaliar a conformidade do uso do equipamento nas tarefas de medição. A calibração é definida como a operação que estabelece uma relação entre os valores das grandezas com as incertezas de medição fornecidas pelos padrões de medição, isto é, a partir de uma amostra padrão os equipamentos são calibrados para exibirem resultados confiáveis. A calibração deve ser efetuada quando se altera o lote de reagente em uso, no intervalo de frequência de calibração indicada ou quando assim se justificar, como por exemplo o aparecimento de erros sistemáticos ou valores de controlo fora dos intervalos aceitáveis. É importante deixar claro que um instrumento calibrado não é necessariamente adequado para uso, mas é um dispositivo cujas tendências foram ajustadas ¹⁴.

A mudança dos lotes de reagentes pode exercer um impacto inesperado sobre os resultados de CQ. Como os valores de CQ e de um reagente podem mudar com um lote diferente, os resultados de CQ podem não constituir um indicador fiável no desempenho de um método analítico após a mudança de lote de um dado reagente sendo necessário efetuar uma nova calibração ¹.

4.5 Acreditação e Certificação

Segundo o Instituto Português de Acreditação (IPAC), a atividade de acreditação, que segue a ISO 15189, consiste na avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade (ensaios, calibrações, certificações e inspeções). A atividade de acreditação está sujeita a legislação comunitária que obriga a um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação. As atividades de avaliação da conformidade visam normalmente demonstrar que um dado produto, processo ou serviço cumpre com os requisitos que lhe são aplicáveis ¹⁵. Enquanto a acreditação, normalmente, é um requisito para exercer determinada atividade de avaliação da conformidade, a certificação é maioritariamente uma opção voluntária de cada laboratório.

Segundo a Associação Portuguesa de Certificação (APCER), a certificação é um processo de avaliação da conformidade, realizado por entidades reconhecidas, que tem como objetivo demonstrar que um dado sistema de gestão, produto, processo ou serviço, cumpre com os requisitos que lhe são aplicáveis. A ISO 9001 é a norma de sistemas de gestão mais utilizada mundialmente, sendo a referência internacional para a Certificação de Sistemas de Gestão da Qualidade ¹⁶.

O laboratório de Patologia Clínica do CHTV, é um laboratório certificado pela Norma ISO 9001:2015, passando, periodicamente por auditorias, garantindo assim a qualidade de excelência.

5. Sala de colheitas

O CHTV disponibiliza 5 salas apropriadas para a realização de colheitas de sangue, e outro tipo de provas funcionais, com abertura às 8h, nas quais tive oportunidade de acompanhar e realizar todo o processo de colheita de sangue.

5.1 Colheitas de Sangue

A colheita de sangue determinada para a realização de exames laboratoriais é feita por meio de punção venosa utilizando sistemas de extração a vácuo da SARSTEDT® S-Monovette.

O uso de sistemas de tubos de extração a vácuo como sistemas fechados para colheita de sangue reduz o risco de exposição direta do sangue e facilita a colheita de várias amostras numa única punção venosa ¹⁷.

Os fatores que influenciam os resultados laboratoriais durante a colheita e transporte incluem ¹⁷:

- uso do calibre correto da agulha para evitar hemólise ou resultados anormais;
- o local de inserção anatômica para punção venosa;
- o uso de tubos de colheita laboratorial recomendados;
- correspondência doente-amostra (ou seja, rotulagem);
- condições de transporte.

Antes de efetuar a colheita deve confirmar-se o nome completo do doente e se este se encontra em jejum de pelo menos 8 horas (caso justifique). Na hora da colheita, escolher uma veia de bom tamanho que seja visível, reta e de bom calibre, de preferência da fossa antecubital ou antebraço (Figura 2). Após a colheita, os tubos devem ser enviados, o mais rápido possível, para o laboratório ¹⁷.

Todas as amostras devem ser colhidas, rotuladas, transportadas e processadas de acordo com as normas estabelecidas para colheita de sangue, que incluem o volume da amostra, a necessidade de manipulações especiais e o tipo de recipiente a usar. O não cumprimento de procedimentos específicos pode levar à sua rejeição. São razões para a sua recusa: amostra inadequada, anticoagulante errado, hemólise, lipemia, coágulos, etc. ¹.

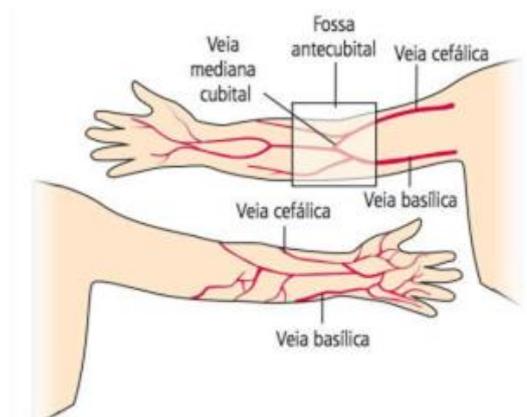


Figura 2: Veias do antebraço, representado o local mais adequado para realizar colheita de sangue ¹⁴⁸.

5.1.1 Tubos utilizados e respetivos anticoagulantes

Para análises bioquímicas é utilizado soro, que é obtido a partir da colheita de sangue para um tubo sem anticoagulante, apenas com gel de separação. Já os outros parâmetros que necessitam que o sangue não coagule, são utilizados tubos com anticoagulante próprio para o parâmetro a analisar.

Os tubos utilizados no Serviço de Patologia Clínica do CHTV da SARSTEDT® S-Monovette estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Caracterização dos tubos utilizados na sala de colheitas do CHTV ¹⁸.

Tubo	Utilidade	Anticoagulante	Exemplo
Tampa vermelha	Indicado para hemograma e/ou velocidade de sedimentação, hemoglobinas glicosiladas, citometrias, doseamento de carga viral, imunofenotipagem, pesquisa de mutações, etc.	K ₃ EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) - preserva a morfologia celular.	
Tampa castanha	Indicado para doseamento de parâmetros de bioquímica, serologia, imunologia, marcadores cardíacos e tumorais em soro.	Não tem anticoagulante. Contudo, tem um gel que durante a centrifugação, forma uma camada de separação estável entre o coágulo de sangue e o soro.	

Tampa verde	Indicado para a realização de todas as pesquisas fisiológicas de coagulação em plasma. É imprescindível cumprir o volume.	Citrate de sodium.	
Tampa rosa	Estudo de possíveis pseudotrombocitopenias que possam acontecer devido ao anticoagulante K ₃ EDTA presente no tubo para hemograma. Apenas para contagem de plaquetas ¹⁹ .	Sulfate of magnesium - effect of antiaggregant of magnesium salts	
Tampa amarela	Used for dosing of glucose or lactate.	Sodium Fluoride	
Tampa laranja	Used in biochemical parameters, study of karyotypes. It should not be used for coagulation tests or hematology.	Heparin-Lithium - useful in small quantities and without significant effect on many determinations ¹ .	

Tampa cinzenta	Doseamento de homocisteína no soro.	Não tem anticoagulante. Apenas gel de separação.	
Gasometrias	Análise de gasometrias arterial ou venosa.	Heparina-Lítio	
QuantiFERON-TB Gold	Auxilia na detecção de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Heparina-lítio	

Cada parâmetro exige a presença de algum tipo de anticoagulante específico ou não, por isso, é necessária a correta colheita para os diferentes tubos de acordo com os parâmetros pedidos. Os anticoagulantes são utilizados quanto há necessidade de obter sangue total ou plasma, a presença de coágulo nessas amostras impossibilita o estudo das mesmas.

A heparina interfere nos testes de coagulação; o K₃EDTA, na dosagem de cálcio; o fluoreto, nos testes de hematologia. Recomenda-se, por isso, seguir a sequência padronizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), agora denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A ordem recomendada na colheita de amostras de sangue é a seguinte ²⁰:

- 1º Frascos de hemocultura
- 2º Tubos secos para amostras de soro
- 3º Tubos com citrato de sódio
- 4º Tubos com gel separador/tubos secos para amostras de soro
- 5º Tubos com heparina/tubos com heparina e gel separador

6º Tubos com K₃EDTA

7º Tubos com fluoreto

5.1.2 Interferentes

Como já foi referido, também existem alterações presentes no sangue que vão interferir com os resultados das amostras e por isso devem ser rejeitadas. Soro hemolisado, ictérico ou lipémico serão explicados em seguida.

5.1.2.1 Hemólise

O processo de hemólise é caracterizado pela quebra acelerada das membranas eritrocitárias, libertando o conteúdo intracelular para o compartimento extracelular. Nesse processo, não é apenas a hemoglobina que é libertada, mas outros componentes do citoplasma eritrocitário como potássio, lactato desidrogenase (LDH), ou enolase neuroespecífica (NSE), fosfato, aspartato aminotransferase (AST), etc. dando origem a alterações aquando da quantificação desses parâmetros ²¹.

A maioria das amostras hemolisadas são rejeitadas na fase pré-analítica de acordo com a deteção visual de interferências séricas, mesmo que os exames solicitados não possam ser interferidos pela hemólise.

A hemólise pode ser devido a razões fisiopatológicas ou a causas exógenas ao doente. Portanto, a hemólise pode ser classificada em dois grandes grupos ²¹:

- Hemólise *in vitro*: A rutura dos glóbulos vermelhos é devido à colheita inadequada de sangue ou manuseio de amostras. Este tipo de hemólise pode ser devido ao uso de agulhas muito finas, mistura inadequada de tubos ou tempo de garrote muito prolongado ou muito apertado, bem como por causas relacionadas com o transporte ou armazenamento das amostras. A amostra não pode ser processada.
- Hemólise *in vivo*: É caracterizada pela lise dos glóbulos vermelhos devido a causas endógenas. A amostra pode ser processada tendo em conta este interferente, que leva, por exemplo, à alteração do valor das bilirrubinas.

5.1.2.2 Icterícia

A icterícia é causada por concentrações elevadas de bilirrubina, que podem ocorrer numa variedade de estados fisiológicos e doenças em crianças e adultos. A presença de bilirrubina, e potencialmente também de produtos de degradação como a biliverdina, pode interferir na análise laboratorial por diversos mecanismos. A um nível amplo, os dois principais mecanismos de interferência ictérica são interferência espectral ou reatividade química com reagentes de ensaio ²².

5.1.2.3 Lipemia

A lipemia torna o plasma ou soro turvo e opaco. Na falta de outras interferências de cor, o plasma/soro lipêmico aparecerá branco leitoso. A causa mais comum de lipemia é o doente não respeitar o jejum. Este tipo de interferência resulta na turbidez da amostra pelo acúmulo de partículas de lipoproteínas e pode afetar a análise laboratorial por diversos mecanismos. Primeiro, a lipemia pode aumentar a absorção de luz e, assim, diminuir a transmitância da luz usada para análise espectrofotométrica. Em segundo lugar, a lipemia pode causar deslocamento de volume, impactando principalmente na análise de eletrólitos. Terceiro, as amostras lipêmicas podem ser não homogêneas, causando problemas com a forma como os analisadores automatizados do laboratório detetam o volume da amostra. Por fim, amostras excessivamente lipêmicas são mais propensas à hemólise. O mecanismo subjacente a este efeito não é completamente compreendido, mas uma teoria é que os lípidos atuam como detergentes que rompem as membranas dos eritrócitos à medida que as amostras são processadas e centrifugadas. O resultado desse fenômeno pode ser uma amostra massivamente hemolisada e lipêmica e praticamente inalisável para alguns exames laboratoriais ²³.

5.2 Provas funcionais efetuadas na sala de colheitas

- PTGO- Prova de Tolerância à Glicose Oral realizada para diagnóstico de diabetes *mellitus* ou diabetes gestacional no caso das grávidas entre as 24 e 28 semanas de gestação. Este teste consiste na ingestão de uma solução de 75g de glicose diluída e são feitas avaliações da glicemia mediante uma colheita de sangue às 0, 1 e 2 horas após a ingestão da solução.
- Teste respiratório para detecção de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) - Para a realização correta do teste, o doente deve cumprir um jejum de pelo menos 9 horas, não tomar qualquer antibiótico nas 4 semanas anteriores, nem tomar qualquer medicamento anti-ulceroso nas 2 semanas anteriores. *H. pylori* é um agente patogênico humano microaeróbio Gram-negativo cuja infecção está fortemente relacionada com muitas doenças gastrointestinais. A infecção por *H. pylori* afeta mais da metade da população adulta em todo o mundo, mas a prevalência da infecção varia amplamente por área geográfica, idade, raça e estado socioeconômico. Para a prática clínica de rotina, o teste rápido da urease é o mais útil para o diagnóstico da infecção por *H. pylori*, por ser barato, rápido, fácil de realizar, altamente específico e amplamente disponível. O teste consiste na detecção de CO₂ produzido pela urease bacteriana. Se *H. pylori* estiver presente converte o reagente do teste de ureia (comprimido administrado) em amônia e CO₂ facilmente detetável no teste ²⁴.

6. Laboratório de Microbiologia

O laboratório de microbiologia clínica ocupa um papel essencial no sistema de saúde, contribuindo para o diagnóstico, tratamento, prevenção e controlo de doenças infecciosas. Fornece um amplo espectro de testes para a deteção e caracterização de patógenos bacterianos, virais, fúngicos e parasitários usando técnicas de diagnóstico convencionais e avançadas ³.

No laboratório de microbiologia do CHTV realizam-se análises bacteriológicas, micológicas, parasitológicas e micobacteriológicas nos diferentes produtos biológicos que chegam diariamente, provenientes de vários serviços do hospital.

Durante o meu período de estágio nesta secção, cerca de dois meses, acompanhei essencialmente a parte de bacteriologia, daí ser a mais descrita neste relatório.

Na rotina da microbiologia, foi possível acompanhar a receção dos produtos, verificando se estes se encontravam em bom estado para análise, no respetivo meio de transporte ou cultura ou se havia a necessidade de realização de testes adicionais, na passagem por equipamentos automáticos, etc. Acompanhei também os controlos realizados nesta secção, e por fim a validação de resultados, essencialmente a visualização das placas semeadas no dia anterior.

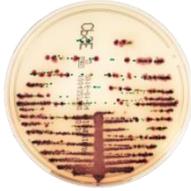
Os controlos efetuados nesta secção são vários e recorrem a metodologias diferentes. Desde controlo, no início do dia, do aparelho de análise de urinas iChemVELOCITY e iQ200 Elite IRIS (Beckman Coulter), para a análise físico-química e do sedimento urinário, respetivamente, até ao controlo da esterilidade dos meios de cultura aquando da mudança de lote e da solução salina utilizada no equipamento VITEK® 2 (BioMérieux). Este setor também está encarregue de assegurar o controlo de esterilidade de todas as câmaras de fluxo laminar presentes em todo o laboratório e no Serviço Farmacêutico do CHTV.

6.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do CHTV estão expostos na Tabela 3, com exceção dos meios de cultura de fezes que serão apresentados na subsecção 6.6.4 (Tabela 8).

Tabela 3: Descrição dos meios de cultura utilizados ^{25,26}.

Meio de cultura	Características	Incubação	Exemplo
Gelose Sangue	Meio não seletivo. Isolamento de bactérias fastidiosas e não fastidiosas. Permite a detecção de hemólise. Gelose Columbia ao qual é adicionado sangue defibrinado de carneiro ou cavalo.	Estufa 37°C com 5% CO ₂ 24-48h	
Gelose Chocolate	Meio não seletivo. Isolamento de bactérias fastidiosas. Este meio é composto por uma base nutritiva enriquecida em fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyViteX. Destina-se particularmente ao crescimento das estirpes mais exigentes: <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	Estufa 37°C com 5% CO ₂ 24-48h	
MacConkey	Meio seletivo e diferencial para a pesquisa de bacilos Gram negativos (<i>Enterobacteriales</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , etc.). Tem na sua constituição sais biliares que inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas. Contém cristal violeta que permite evidenciar a fermentação da lactose pela mudança de coloração do vermelho neutro. Os microrganismos que fermentam a lactose originam colônias rosa ou vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliares. Já os que não fermentam a lactose, originam colônias incolores ou ligeiramente bege.	Estufa 37°C 24h	
Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol	Meio seletivo de leveduras e fungos. A presença de antibióticos (cloranfenicol e gentamicina) inibe o crescimento de quase todas as espécies de bactérias.	Estufa 37°C 24-48h	

CPSE	Meio cromogéneo para o isolamento, contagem e identificação direta ou presuntiva de microrganismos de infecção do trato urinário. Sensibilidade de deteção e especificidade de coloração, para fácil leitura, mesmo em culturas mistas.	Estufa 37°C 24h	
Granada	Meio seletivo diferencial. Meio cromogéneo para o rastreio de <i>Streptococcus</i> do grupo B. Útil em rastreios pré-natal.	Estufa 37°C com 5% CO ₂ 24h	
Gelose <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes	Meio seletivo diferencial. Meio cromogéneo para isolamento e deteção de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina.	Estufa 37°C 24h	
Candy	Meio seletivo diferencial. Meio cromogéneo para o isolamento das espécies comuns de <i>Candida</i> incluindo: rosa/roxo- <i>Candida albicans</i> ; turquesa esféricas- <i>Candida tropicalis</i> ; turquesa achatadas- <i>Candida glabrata</i> ; turquesa com aspeto seco e irregular- <i>Candida krusei</i> . Os substratos cromogéneos específicos na gelose são hidrolisados quando entram em contacto com as leveduras, resultando numa coloração específica para uma identificação clara, mesmo em culturas mistas.	Estufa 37°C 24h	
Mueller-Hinton	Meio não seletivo. É um meio usado para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em agar. Desenvolvido de acordo com as recomendações EUCAST.	Estufa 37°C 24h	

<p>Mueller-Hinton Sangue</p>	<p>Meio não seletivo. É um meio usado para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em agar que permite o crescimento de bactérias exigentes (<i>Streptococcus pneumoniae</i>, outros <i>Streptococcus</i>, <i>Haemophilus</i>, <i>Moraxella</i>). Desenvolvido de acordo com as recomendações EUCAST.</p>	<p>Estufa 37°C com 5% CO₂ 24h</p>	
<p>Gelose Chocolate VCA3</p>	<p>Meio seletivo para isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>. Meio semelhante à Gelose Chocolate com adição de uma combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos permitindo maior seletividade: Vancomicina, Colistina, Anfotericina e Trimetoprim.</p>	<p>Estufa 37°C com 5% CO₂ 24-48h</p>	
<p>BHI</p>	<p>Brain Heart Infusion. Meio enriquecido líquido não seletivo, de uso geral, utilizado no isolamento e cultura de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos.</p>	<p>Estufa 37°C 24h</p>	
<p>Lowenstein-jensen</p>	<p>Meio seletivo para o isolamento de micobactérias.</p>	<p>Estufa 37°C, 45 dias</p>	

MGIT*	Meio de enriquecimento para micobactérias.	Estufa 37°C, 42 dias	
-------	--	----------------------	---

* O Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) contém 7 mL de base de meio Middlebrook 7H9 modificado. O meio completo, enriquecido com OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrose, Catalase) e mistura de antibióticos inibidores PANTA (Polimixina, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico, Trimetopim, Azlocilina), é um dos meios líquidos mais utilizados para a cultura de micobactérias. O sistema BD BACTEC MGIT (Quilaban) é um método automatizado para isolamento primário de micobactérias a partir de amostras biológicas (exceto sangue) ²⁷. Os tubos contêm um composto fluorescente, embebido em silicone, que é sensível à presença de oxigênio dissolvido no meio. Primeiramente, uma grande quantidade de oxigênio dissolvido extingue as emissões do composto e pouca fluorescência pode ser detetada. Posteriormente, os microrganismos consomem o oxigênio existente causando a emissão de fluorescência e conseqüentemente a sua detecção por parte do equipamento. Um tubo com resultado positivo contém cerca de 10⁵ a 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Os frascos que não positivarem até 42 dias são dados como negativos ²⁷. Quando os frascos são considerados positivos é feita uma lâmina que será corada pela coloração de Ziehl-Neelsen de modo a avaliar, microscopicamente, a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (B.A.A.R.). Caso se esteja perante uma contaminação, efetua-se a respetiva descontaminação e semeia-se no meio Lowenstein-Jensen. Se se verificar a presença de B.A.A.R. ou existir crescimento no meio referido, efetua-se um teste imunocromatográfico para detetar a presença da proteína MPT 64, uma das proteínas exclusivamente encontrada em *Mycobacterium tuberculosis*.

6.2 Análise microscópica

As amostras clínicas ou suspensões de microrganismos podem ser colocadas numa lâmina de vidro, cobertas com uma lamela e examinadas ao microscópio (ou seja, exame direto a fresco). Embora grandes organismos (por exemplo, elementos fúngicos, parasitas) e material celular possam ser observados usando este método, a análise dos detalhes internos é muitas vezes difícil. Alternativamente, a amostra pode ser fixada e corada por corantes diferenciais usados para marcar organismos específicos ou componentes de material celular

6.2.1 Coloração de Gram

No laboratório é utilizado um equipamento que faz a coloração de forma automática. PREVI Color Gram® (BioMérieux) é um sistema automatizado usado para a coloração de Gram em sistema de centrifugação. O seu procedimento consiste numa coloração primária com violeta de cristal, iodo da solução de Lugol como fixador, acetona como descorante e por fim safranina/fucsina para contra corar ²⁹.

A coloração de Gram distingue facilmente dois grupos de bactérias, Gram positivas e Gram negativas, tendo por base a sua parede celular e a permeabilidade da membrana (Figura 3). As bactérias Gram negativas apresentam uma membrana exterior e uma fina camada de peptidoglicano fazendo com que percam a coloração de violeta de cristal e sejam coradas de rosa avermelhado quando aplicada a safranina. Já as bactérias Gram positivas, não contêm uma membrana externa e apresentam uma espessa camada de peptidoglicano, que quando aplicado o violeta de cristal vai reter o corante, dando origem a uma coloração azul/arroxeadada ^{28,30} (Figura 4).

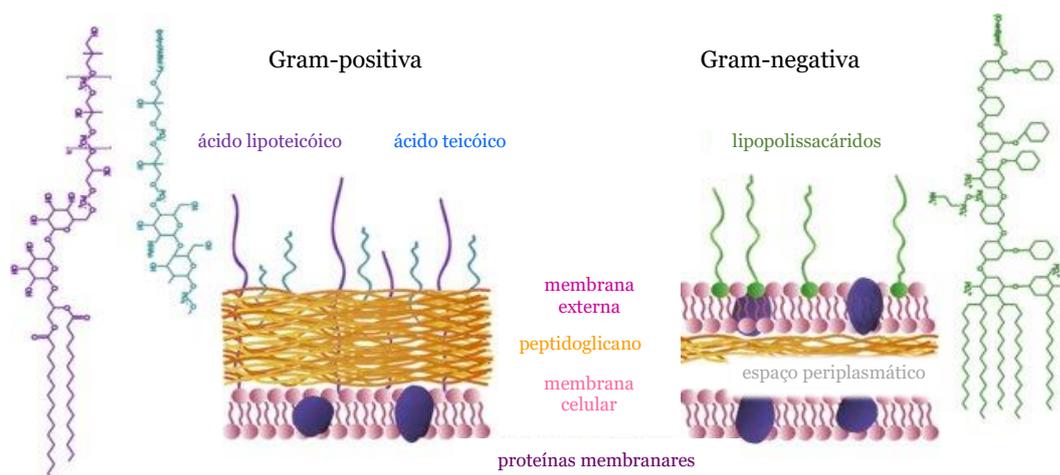


Figura 3: Diferença entre uma bactéria Gram positiva e uma Gram negativa. Imagem adaptada de ¹⁴⁹.

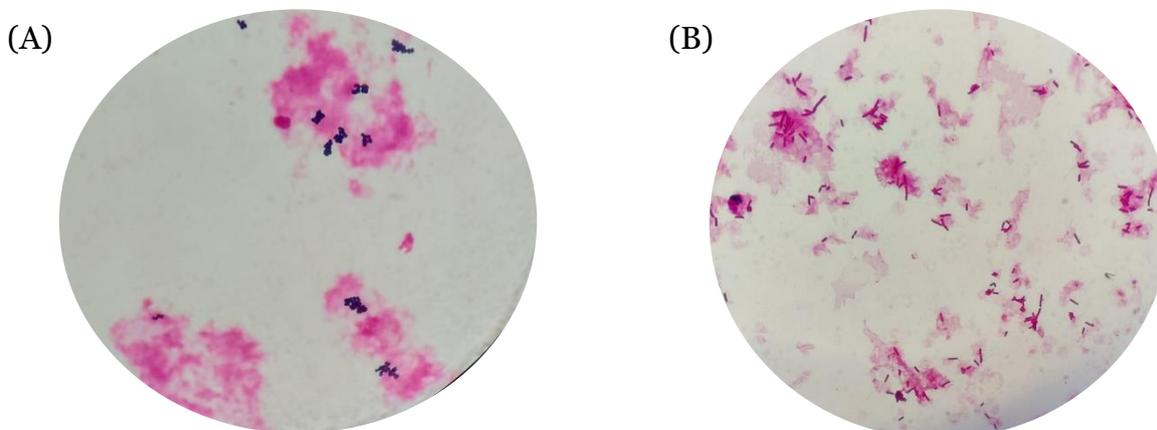


Figura 4: (A) Cocos Gram positivos e (B) Bacilos Gram negativos. Imagens obtidas do laboratório de microbiologia do CHTV.

6.2.2 Coloração de Ziehl-Neelsen

A coloração de Ziehl-Neelsen é outro importante procedimento de coloração diferencial. É mais comumente usada para identificar B.A.A.R., como *Mycobacterium tuberculosis*, o patógeno responsável pela tuberculose. Esta bactéria possui uma parede celular com alto teor de lípidos, em particular, os ácidos micólicos - um grupo de hidroxilípidos de cadeia ramificada, que impede que os corantes se liguem prontamente às células. O método de Ziehl-Neelsen, utiliza calor e fenol para promover a penetração da fucsina básica nas células. Uma vez que a fucsina básica tenha penetrado, *M. tuberculosis* não é facilmente descorado pelo álcool acidificado e, portanto, é considerado ácido-resistente, sendo atribuído o nome de bacilo álcool-ácido resistente, mantendo-se corado de rosa (Figura 5). Bactérias não álcool-ácido resistentes são descoradas e, portanto, são coradas de azul pela contra coloração de azul de metileno ^{28,31}.

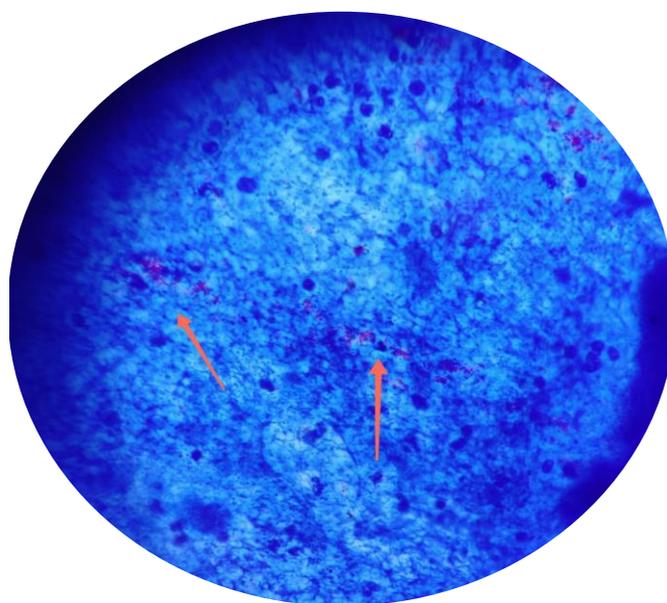


Figura 5: Imagem microscópica de B.A.A.R com coloração de Ziehl-Neelsen. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.

6.3 Técnicas de sementeira em meios sólidos

As formas possíveis de semear em meios sólidos são as seguintes ²⁶:

- Por quadrantes ou em roseta (Figura 6A) - colocar uma pequena porção de produto num quadrante e proceder à sementeira com a ansa pelo método de estrias (esgotamento).

- Por inundação- colocar, com uma pipeta, uma pequena gota do produto e deixar espalhar.
- Por espalhamento com zaragatoa- utilizado para a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por difusão em placa. Após realização da suspensão, passar a zaragatoa na placa em 3 direções e em 2 sentidos cada.
- Para análise semiquantitativa de colónias (Figura 6B) - utilizada em urinas

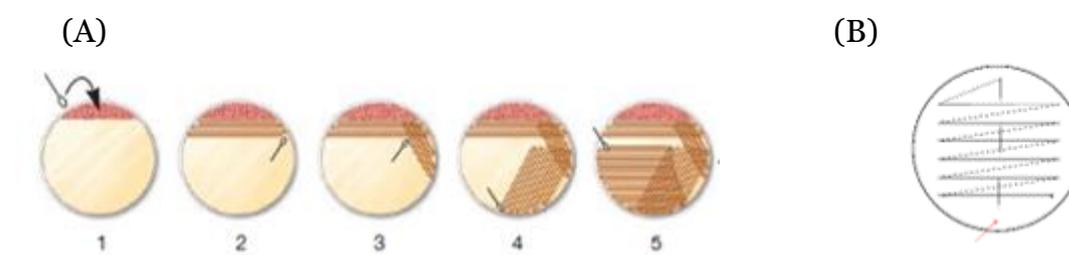
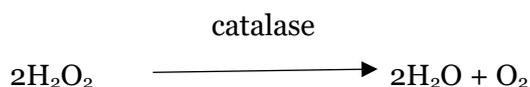


Figura 6: Técnicas de sementeira em meios sólidos. (A)- Técnica por quadrantes, figura adaptada de ³¹ e (B)-Técnica para análise semiquantitativa de urinas, figura adaptada de ¹⁵⁰.

6.4 Testes auxiliares à identificação de microrganismos

6.4.1 Teste da catalase

A catalase é uma enzima que converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio.



Este teste consiste em colocar em contacto uma colónia em estudo com uma gota de peróxido de hidrogénio. Se borbulhar significa que o microrganismo é produtor da enzima catalase. Este teste é utilizado para diferenciar *Streptococcus* (catalase negativo) de *Staphylococcus* (catalase positivo) e *Bacillus* (catalase positivo) de *Clostridium* (catalase negativo) ³¹.

6.4.2 Teste da oxidase

Deteta a presença do citocromo c oxidase que é capaz de reduzir oxigénio e aceitadores artificiais de eletrões. Este teste é realizado através de um kit comercial, contendo solução aquosa a 1% de dicloridrato de N,N,N,N-tetrametil-para-fenilenodiamina, em que é colocada uma colónia numa tira de papel impregnado com o reagente, e se este alterar a sua

cor para roxo significa que o microrganismo é produtor da enzima oxidase. Este teste é importante para distinguir *Neisseria* e *Moraxella spp.* (oxidase positivo) de *Acinetobacter* (oxidase negativo), e *Enterobacterales* (oxidase negativo) de *Pseudomonas spp.* (oxidase positivo) ³¹.

6.4.3 Teste da coagulase

O teste da coagulase deteta a presença desta enzima que é produzida por alguns microrganismos e que promove a coagulação do plasma. Este teste consiste em adicionar uma colônia em estudo a um plasma de citrato saudável. Se após 4h na estufa de 37°C existir formação de coágulo então o microrganismo é coagulase positivo. Este é um teste importante para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulase positivo) de *S. epidermidis* (coagulase negativo) ou outros *Staphylococcus* coagulase negativo ³¹. Pastorex™ Staph-Plus (BioRad Laboratories) é um teste de aglutinação rápido, que tem por base o fundamento do teste da coagulase, para a detecção simultânea dos três seguintes componentes específicos de *Staphylococcus aureus*:

- 1) o fator de afinidade de fibrinogénio, também referido como coagulase ligada ou "fator de acumulação" (*clumping factor*);
- 2) a proteína A, que possui uma afinidade para o fragmento cristalizável (Fc) de imunoglobulinas;
- 3) os polissacarídeos capsulares de *S. aureus*.

O reagente é produzido com partículas de látex sensibilizadas por fibrinogénios e imunoglobulinas, assim como anticorpos monoclonais específicos dirigidos contra polissacarídeos capsulares de *S. aureus*. Os isolados de cultura de *S. aureus* são misturados com o reagente de látex numa lâmina. Após a mistura, a lâmina é avaliada visualmente quanto à presença de aglutinação, que indica a presença de *S. aureus* ³².

6.4.4 Teste do indol

O teste de indol é um procedimento qualitativo que permite determinar a capacidade que a bactéria tem de produzir indol, por meio de desaminação redutiva do triptofano, isto é, determina a capacidade de certas bactérias que possuem a enzima triptofanase de degradar o triptofano, produzindo indol, ácido pirúvico e amónia. O teste consiste em adicionar uma colônia ao Reagente de Kovacs, ocorrendo a formação de um anel de coloração vermelha na superfície do meio após incubação a 37°C, indicando uma reação positiva, num período de 30 segundos. Os microrganismos indol negativos não produzem alteração da cor, permanecendo amarelo. Permite distinguir *Escherichia coli* (indol positivo) de *Klebsiella pneumoniae* (indol negativo) ³³.

6.4.5 Teste da urease

Este teste detecta a urease, a enzima que catalisa a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amônia. Para executar o teste, uma colônia do microrganismo é inoculada no meio de cultura contendo ureia e o indicador de pH vermelho de fenol. Quando a ureia é hidrolisada, a amônia acumula-se no meio e torna-o alcalino. Ocorre aumento no pH, causando a mudança de cor no indicador de amarelo para rosa, indicando uma reação positiva. A ausência de mudança na coloração indica um teste negativo. Este teste é utilizado para distinguir *Proteus*, *Providencia rettgeri* e *Klebsiella pneumoniae* (urease positivo) de *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (urease negativo) ³¹.

6.4.6 Teste da optoquina

A optoquina (etil-hidrocupreína hidrocloreídica) é um fármaco solúvel em água que se difunde rapidamente pelo meio de cultura sólido. Para este teste utiliza-se um disco de 6 mm contendo 5 µg de optoquina. A presença de um halo ≥ 14 mm indica que a cultura é sensível à optoquina, identificando presuntivamente *Streptococcus pneumoniae* ²⁸.

6.4.7 API®

É um método estabelecido para a identificação manual de microrganismos ao nível da espécie. Os produtos de identificação API® (BioMérieux) (Figura 7) são kits de teste para identificação de bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras. As tiras API® fornecem identificações precisas com base em bancos de dados extensos e consistem em sistemas de teste padronizados e fáceis de usar. Os kits incluem tiras que contêm até 20 testes bioquímicos em miniatura, que permitem a identificação do organismo em estudo ³⁴.



Figura 7: Sistema de identificação API®. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.

6.4.8 Pesquisa de antígenos de Lancefield

Este sistema de classificação serológica de Lancefield (método originalmente desenvolvida pela microbiologista Rebecca Lancefield) é baseado em reações que testam a reatividade serológica de antígenos específicos de grupo ou substâncias C que podem ser polissacarídeos, ácidos teicóicos ou ácidos lipoteicóicos. Estes serogrupos (ou grupos de Lancefield) são designados por letras, de A a H e de K a V. Alguns antígenos existem em mais do que uma espécie. É um método de classificação amplamente aceite para a identificação primária de espécies de *Streptococcus*. O ensaio Pastorex™ Strep® (Bio Rad Laboratories) utiliza uma extração enzimática simples. O antígeno contido na extração é identificado utilizando partículas de látex revestidas com anticorpos homólogos específicos do grupo. Na presença de antígenos homólogos, as partículas de látex aquando contacto com a colónia em estudo aglutinam-se. Na ausência de antígenos, estas permanecem numa suspensão homogénea ³⁵.

6.4.9 VITEK® 2

No CHTV, a maioria dos microrganismos são identificados através do sistema automatizado de identificação VITEK® 2 (BioMérieux) (Figura 8), permitindo também realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Este sistema usa cartas de identificação que contêm diferentes substratos bioquímicos que permitem identificar os diferentes microrganismos. As cartas de reagentes têm poços que podem conter, cada um, um substrato de teste individual. Os substratos medem várias atividades metabólicas, como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibitórias, permitindo assim identificar o microrganismo presente na suspensão.

O sistema VITEK® 2 também permite a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos de forma automatizada. As cartas de antibiograma específicas para o microrganismo têm diferentes concentrações de antibióticos liofilizados.



Figura 8: Sistema automatizado VITEK® 2. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.

As cartas disponíveis no laboratório de microbiologia são as seguintes ³⁶:

Cartas de Identificação (Figura 9):

- GP-Identificação de bactérias Gram Positivas
- GN-Identificação de bacilos Gram Negativos fermentadores e não fermentadores
- NH- Identificação de *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.* e outras bactérias gram-negativas fastidiosas
- YST- Identificação de Leveduras



Figura 9: Cartas de Identificação usadas no Vitek 2 ¹⁵¹.

Cartas de Antibiograma (Figura 10):

- AST 576- Antibiograma de *Streptococcus pneumoniae*
- AST 586- Antibiograma de *Enterococcus*
- AST 648- Antibiograma de *Staphylococcus*
- AST 373- Antibiograma de *Pseudomonas spp.*
- AST 355- Antibiograma de Bacilos Gram Negativos
- AST ST03- Antibiograma de *Streptococcus*
- AST YSo8- Antibiograma de Fungos



Figura 10: Carta de antibiograma usada no Vitek 2 ¹⁵².

Previamente é preparada uma suspensão tendo em conta a escala de MacFarland, de acordo com as especificidades do microrganismo a identificar, descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Densidade ótica, conforme a escala de MacFarland, das suspensões necessárias para a realização de identificações ou antibiogramas.

Microrganismos	Densidade ótica (McFarland)
<i>Streptococcus, Enterococcus</i>	0,55-0,70
Leveduras	1,8-2,2
<i>Haemophilus</i>	2,8-3,3
Outros	0,55-0,65

A determinação da sensibilidade aos antibióticos neste sistema baseia-se no cálculo da concentração inibitória mínima (CIM) dos diferentes antibióticos contidos nas cartas.

6.4.10 Teste de sensibilidade aos antibióticos manual com discos e E-Test

Quando a sensibilidade aos agentes antimicrobianos não pode ser detetada pelo sistema automatizado, ou é necessário confirmar um resultado, podem ser realizados testes de suscetibilidade recorrendo a discos de antimicrobianos ou a tiras com gradiente de concentração de antibiótico que possibilitam determinar a CIM em placa, conhecidos como E-test (Figura 11). O E-test é uma tira plástica disponível comercialmente, impregnada por concentrações crescentes do antimicrobiano com a escala das concentrações testadas a fim de facilitar a leitura do resultado. Este teste baseia-se na difusão do gradiente antimicrobiano no agar para a determinação da sensibilidade da amostra bacteriana ao antimicrobiano testado. A preparação do inóculo é feita da mesma maneira que no teste de difusão em disco.

Já os discos de antibiótico são utilizados para realizar testes de suscetibilidade antimicrobiana semiquantitativos, recorrendo ao método de difusão em disco. Trata-se de um teste de difusão em agar que foi descrito em 1966 por Bauer e Kirby. Estes testes são realizados tendo em conta as normas padronizadas para a realização de antibiogramas pelo método de difusão em agar (EUCAST-*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Os testes podem ser realizados em placas de meio Mueller-Hinton, ou no caso de microrganismos mais fastidiosos usa-se Mueller-Hinton sangue ou gelose chocolate, preparando uma suspensão previamente, com um valor de densidade ótica

dependendo do microrganismo em estudo (Tabela 4), e com uma zaragatoa passar diretamente na placa em 3 direções e em 2 sentidos cada.



Figura 11: E-Test ¹⁵³.

6.5 Produtos Biológicos

6.5.1 Hemoculturas

As culturas de sangue são úteis para o diagnóstico da bacteriemia, identificação do agente causal e para a seleção do tratamento antimicrobiano adequado. Uma vez que o sangue é um produto biologicamente estéril, o isolamento de um microrganismo, a partir de uma hemocultura, é geralmente o agente responsável pela infecção em causa ³⁷.

As hemoculturas geralmente são requisitadas quando os doentes apresentam febre, calafrios, leucocitose, choque séptico, suspeita de endocardite ou antes de iniciar o tratamento antimicrobiano em doentes idosos ou imunocomprometidos ³⁷.

O número de amostras deve ser no mínimo duas por episódio infeccioso, sendo que cada punção venosa corresponde a dois frascos para adultos (aeróbios e anaeróbios) ou um frasco para crianças até 13kg. Cada amostra deve ser colhida de punções separadas e de sítios anatómicos diferentes, isto é, de diferentes veias periféricas ³⁸.

A colheita de sangue é feita por punção venosa de uma veia periférica, respeitando todas as regras de assepsia, e o volume colhido deve respeitar o volume indicado no frasco ²⁶. Recomenda-se que, preferencialmente, as hemoculturas de rotina incluam frascos emparelhados de hemocultura aeróbia e anaeróbia, sendo esta última colhida primeiramente ³⁸.

Efetuada a colheita, as garrafas (Figura 13) são introduzidas no aparelho BACTEC 9240, (Becton Dickinson - Quilaban). Este aparelho analisa a positividade através da medição da fluorescência pelo corante do sensor existente no fundo do frasco, originada pela atividade metabólica dos organismos que libertam CO₂ ³⁹. Em seguida é apresentada uma figura representativa do funcionamento do aparelho (Figura 12) e na Tabela 5 estão descritas as garrafas utilizadas.

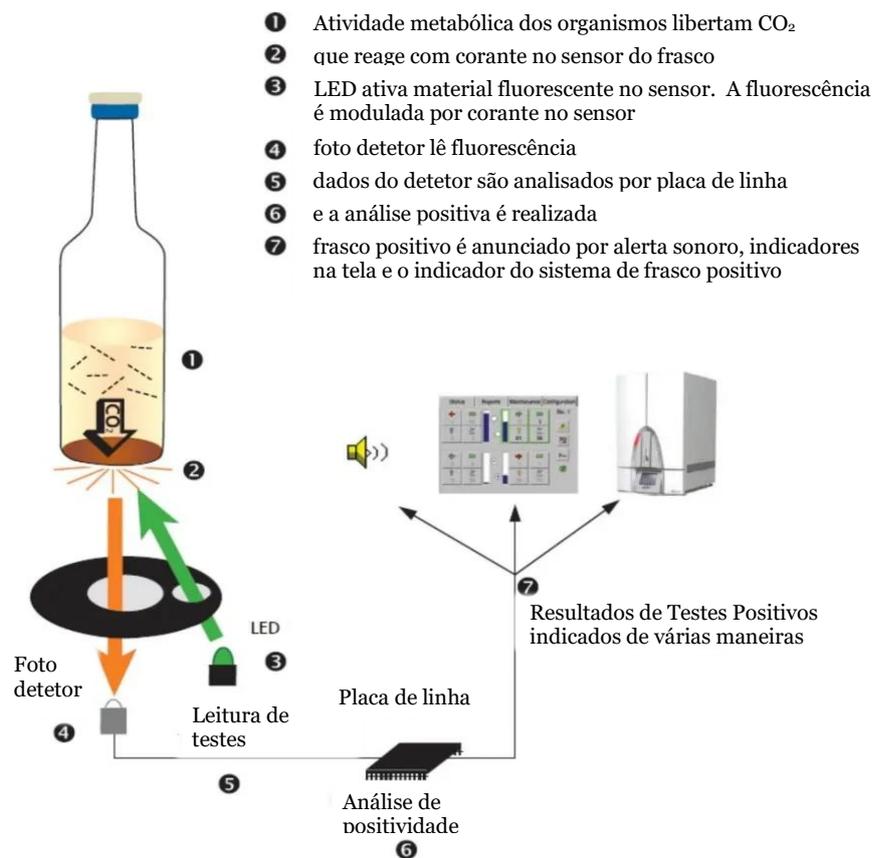


Figura 12: Modo de funcionamento do BACTEC 9240 ¹⁵⁴.

Tabela 5: Garrafas de hemocultura utilizadas no laboratório de microbiologia ^{38,40}.

Tipo de garrafa	Tempo de incubação	Volume
Azul-Aeróbios	5 dias	8 a 10 mL
Roxa-Anaeróbios	5 dias	8 a 10 mL
Vermelha-Micobactérias	43 dias	1 a 5 mL
Verde-Fungos	15 dias	8 a 10 mL
Rosa claro-Pediátricas	5 dias	1 a 3 mL

Durante o respetivo tempo de incubação, caso o resultado seja positivo, realiza-se a passagem do meio líquido para um meio de cultura sólido, nomeadamente gelose de sangue e gelose de chocolate.

Na câmara de fluxo laminar, à chama, desinfeta-se a tampa da garrafa, insere-se a agulha e deita-se uma gota de sangue sobre o meio de cultura sólido de modo a semear a amostra, por estrias, com uma ansa, fazendo também lâminas para a coloração de Gram. No caso de as garrafas para identificação de fungos, semeia-se também a amostra em meio Sabouraud. Na Tabela 6 estão indicados os microrganismos a ter em conta no caso de infeção ou de contaminação.



Figura 13: Garrafas de hemocultura disponíveis no CHTV.

Tabela 6: Microrganismos a considerar no caso de infeção ou excluir no caso de contaminação ³⁸.

Microrganismos de alto valor preditivo positivo para bacteriemia	Microrganismos associados a contaminação
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Escherichia coli</i> e outras <i>Enterobacterales</i> • <i>Neisseria meningitidis</i> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Brucella spp.</i> • <i>Streptococcus pyogenes</i> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Corynebacterium spp.</i> • <i>Micrococcus spp.</i> • <i>Bacillus spp.</i> • <i>Propionibacterium acnes</i>

<ul style="list-style-type: none"> • <i>Haemophilus influenzae</i> • Membros do grupo <i>Bacteroides fragilis</i> • <i>Candida spp.</i> • <i>Cryptococcus spp.</i> • <i>Streptococcus viridans</i> • <i>Enterococcus spp.</i> • <i>Staphylococcus coagulase negativo.</i> 	
--	--

6.5.2 Cateteres

Cateteres venosos centrais (CVC) são indispensáveis na prática médica moderna, particularmente em unidades de cuidados intensivos. O acesso venoso central pode ser necessário por longos períodos nesses doentes e o cateter pode ser manipulado várias vezes ao dia para a administração de fluidos, medicamentos e hemoderivados. No entanto, os CVCs são uma fonte significativa de complicações de bacteriemia e fungemia, bem como de infecções no local de inserção. Quando acompanhado por hemoculturas positivas, indica uma provável infecção da corrente sanguínea, sendo o foco o CVC ⁴¹.

O método semiquantitativo descrito por Maki é o mais amplamente utilizado para descrever a relação entre colonização do cateter e a infecção. Com auxílio de uma pinça estéril, em movimentos aleatórios, liberta-se o conteúdo do segmento distal do cateter sobre a superfície de uma placa de gelose sangue. Após incubação, é realizada a contagem de colônias. Esta técnica avalia apenas a superfície externa do cateter. O crescimento de ≥ 15 UFC confirma a colonização do cateter ²⁶.

6.5.3 Urinas

As infecções do trato urinário (ITU) são uma das infecções mais comuns no Homem, sendo geralmente causadas por bactérias da flora intestinal saprófita que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra ²⁶. As ITU são as infecções nosocomiais mais frequentes, sendo na sua maioria associadas a cateterização vesical.

Mais de 80% das infecções do trato urinário são causadas por uma única espécie bacteriana ⁴². *E. coli* é o microrganismo mais frequente na infecção aguda. As espécies de *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Enterococcus* são mais frequentemente isoladas de doentes internados, ao passo que existe uma maior preponderância de *E. coli* em ambulatório ⁴³.

Quanto à recolha de urina, esta pode ser colhida por diferentes formas ^{26,44}:

- Micção jato médio- correspondente à primeira urina da manhã; após lavagem dos genitais externos, desprezar a parte inicial e terminal da micção, recolher para um frasco esterilizado apenas o jato médio.

- Punção de cateter urinário- após desinfecção do local de punção, aspirar a urina com agulha e seringa onde será transportada (nunca colher diretamente do saco de algália).
- Punção supra púbica - após desinfecção da pele, puncionar a bexiga na região supra púbica e enviar a urina na própria seringa. Este método é indicado para crianças às quais não é possível efetuar a colheita através de outros métodos.

Após a colheita, a urina deve ser analisada o mais rapidamente possível, ou na impossibilidade deve ser refrigerada a 4°C.

No laboratório efetua-se uma leitura físico-química e do sedimento urinário pelo aparelho iChem®VELOCITY e iQ200® Elite IRIS (Beckman Coulter), respetivamente.

O método de funcionamento do iChem®VELOCITY consiste na leitura de tiras teste por refletância. Estas tiras contêm locais de reação impregnados de reagente, possibilitando a determinação de vários parâmetros, nomeadamente, pH, bilirrubina, urobilinogénio, proteínas totais, corpos cetónicos, nitritos, leucócitos, eritrócitos e a determinação da densidade específica utilizando o índice de refração. Para o estudo do sedimento, o aparelho dá informações acerca da presença de células, cilindros, cristais, bactérias e outras estruturas. Já o iQ200® Elite IRIS baseia-se na captura de imagens do fluxo planar de partículas de urina através de uma câmara incorporada ^{45,46}.

No caso do exame microbiológico, a urina é semeada em meio CPSE (BioMérieux) com uma ansa de 1µL para posteriormente proceder à contagem de colónias. Após incubação a 37°C durante 18 a 24 horas, efetua-se a leitura do meio de cultura de modo a verificar a presença de contaminantes ou de uma contagem sugestiva de infeção urinária. Segundo os critérios de Kass, uma contagem de colónias $\geq 10^5$ é significativo de infeção ²⁶. A leitura é efetuada conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Leitura do número de colónias convertido em UFC.

Número de colónias presentes no meio	Significado em UFC/mL
1	10^3
1-10	10^3 - 10^4
10	10^4
10-100	10^4 - 10^5
100	10^5
>100	> 10^5

Depois de confirmação de infeção, realiza-se uma identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

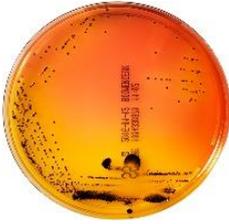
6.5.4 Fezes

As infeções gastrointestinais são um grupo de doenças infecciosas agudas do trato gastrointestinal causadas por vírus, bactérias ou parasitas transmitidos por alimentos ou água contaminados, meio ambiente, contacto com animais ou contacto com outra pessoa doente. Os sintomas de infeção gastrointestinal incluem vômitos, diarreia, febre e dor abdominal. Embora os sintomas muitas vezes desapareçam sem complicações, podem progredir para consequências mais graves, como desidratação e morte, especialmente em idosos, pessoas muito jovens ou naqueles com pré-condição de saúde existente ⁴⁷.

Uma coprocultura (exame bacteriológico das fezes) exige apenas uma amostra, do tamanho de uma noz e, se possível, escolher uma porção com alterações, sendo muco, pus ou sangue. No caso da pesquisa de toxina de *Clostridium difficile* só deverão ser enviadas fezes diarreicas ²⁶. A amostra também pode vir em zaragatoa quando é necessária a pesquisa de carbapenemases em fezes por PCR ⁴⁴.

No exame bacteriológico, retira-se um pouco da amostra do frasco de colheita e semeia-se em meio seletivo para *Salmonella* e *Shigella*, meio SS, e em meio de enriquecimento - caldo GN. Após 6-12 horas, passa-se do meio de enriquecimento para SS. No caso de idade inferior a 2 anos, semeia-se a amostra também em meio seletivo para pesquisa de *Campylobacter spp.* e para *Yersinia enterocolitica*, depois coloca-se em meio de enriquecimento GN. A descrição de todos os meios utilizados para a cultura deste produto biológico está presente na Tabela 8.

Tabela 8: Meios utilizados na cultura de fezes ²⁵.

Meio	Características	Incubação	Exemplo
SS	Meio seletivo diferencial para o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> . Inibição dos coliformes pelo verde brilhante e sais biliares. A presença de sais de ferro permite a deteção de estirpes produtoras de H ₂ S.	24h numa estufa a 37°C	

Caldo GN	Meio seletivo líquido enriquecido para cultura de microrganismos entéricos Gram-negativos, especialmente para <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>	6h-12h numa estufa a 37°C	
Yersinia CIN	Meio seletivo para diferenciação utilizado para o isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> .	48h numa estufa a 30°C	
Campy	Meio seletivo de <i>Campylobacter spp.</i>	48h numa estufa a 37°C em saco com exsiccador que permite a microaerofilia	

Após o tempo de incubação respetivo, é possível identificar as colónias segundo a sua morfologia, contudo é necessária confirmação através de identificação usando o VITEK® 2 (BioMérieux).

As colónias suspeitas de *Yersinia enterocolitica* apresentam uma coloração rosa-clara com um ponto escuro no centro, geralmente alongada.

As colónias suspeitas de *Shigella* têm um aspeto rosado ou incolores.

As colónias suspeitas de *Salmonella* apresentam uma coloração negra.

As colónias suspeitas de *Campylobacter* têm um aspeto acinzentado, geralmente com brilho metálico, planas e húmidas, com tendência a espalhamento ⁴⁸.

Neste produto biológico, pode também ser pedido um teste que avalie a presença de *Clostridium difficile* (*C. difficile*) e o seu potencial toxigenico.

C. difficile é um bacilo anaeróbio Gram-positivo, formador de esporos, amplamente distribuído no trato intestinal dos humanos, dos animais e no meio ambiente. A infeção por *C. difficile* ocorre principalmente como resultado da transmissão por esporos (transmissão via fecal-oral), sendo estes resistentes ao calor, ácidos e antibióticos ^{49,50}.

Após o tratamento com antibióticos, muitos doentes desenvolvem problemas gastrintestinais, que vão desde diarreia leve a colite pseudomembranosa grave. Muitos casos das formas mais leves da doença gastrintestinal e a maioria dos casos de colite pseudomembranosa são causados por estripes toxinogénicas de *C. difficile*. Encontram-se descritas duas toxinas: A - que é uma enterotoxina capaz de produzir acúmulo de líquido nas ansas intestinais e B - uma potente citotoxina capaz de provocar efeitos citopatogénicos em diferentes linhagens de células de culturas de tecidos ⁵¹.

Os testes que detetam antígenos de *C. difficile* são baseados na deteção de glutamato desidrogenase (GDH) e são caracterizados pela facilidade de uso e tempo de resposta rápido, bem como uma especificidade de quase 100%. O teste C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (Alere) (Figura 14) utiliza anticorpos específicos de GDH e das toxinas A e B de *C. difficile*. Os complexos do conjugado antígeno-anticorpo migram através de um filtro para uma membrana onde são capturados pela GDH imobilizada específica e anticorpos específicos das toxinas A e B. O teste contém um controlo interno que valida o ensaio ⁵⁰. No caso do CHTV, quando ocorre uma reação positiva no teste imunocromatográfico procede-se à confirmação através de um teste de PCR realizada no equipamento GeneXpert® (Cepheid) que permite também avaliar a toxicidade de *C. difficile*, detetando o gene específico.

O tratamento só deve ser iniciado em doentes com sintomas. A presença da toxina *C. difficile* sem sintomas de infeção não é uma indicação para tratamento. Os dois antibióticos recomendados para o tratamento são metronidazol e vancomicina ⁴⁹.



Figura 14: Teste *C. difficile* Quik Chek Complete®. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.

6.5.4.1 Outros testes efetuados nas fezes

Pesquisa de sangue oculto- O teste de sangue oculto nas fezes está estabelecido como um método de triagem para o cancro colorretal. Este teste destina-se a doentes com cancro colorretal assintomáticos, e alguns precursores deste cancro, que podem libertar pequenas quantidades de sangue nas fezes não visíveis a olho nu ⁵².

No laboratório é utilizado o Teste FOB Chemtrue One-Step® (Chemtrue) que é um teste imunocromatográfico rápido e visual para a deteção qualitativa de hemoglobina de sangue humano em amostras fecais ⁵³.

O Teste FOB Chemtrue® One-Step deteta hemoglobina humana em amostras fecais recorrendo à interpretação visual do aparecimento de uma cor na cassette de teste.

Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus- A gastroenterite aguda pode ocorrer em qualquer idade, mas os agentes etiológicos e a gravidade da doença podem variar dependendo da idade. Vários estudos têm demonstrado que as causas mais frequentes de gastroenterite não bacteriana são rotavírus e adenovírus entérico, mais particularmente em crianças na faixa etária dos 0 aos 5 anos. Os sintomas geralmente começam dentro de 24 a 48 horas e podem variar de diarreia aquosa leve após febre e vômitos até desidratação grave e choque. Essas infeções também podem causar diarreia leve a grave em adultos, e os indivíduos imunocomprometidos são particularmente suscetíveis. A transmissão é feita via fecal-oral ^{54,55}.

O teste usado no laboratório, CerTest® Rotavirus+Adenovirus Combo Card Test (Biotec) (Figura 15) consiste num ensaio imunocromatográfico de um só passo para a deteção qualitativa simultânea de antígenos de Rotavírus e Adenovírus em amostras de fezes.



Figura 15: CerTest® Rotavirus+Adenovirus Combo Card Test. Imagem obtida do laboratório de microbiologia do CHTV.

Parasitas fecais- As infecções parasitárias, causadas por helmintas intestinais e protozoários, estão entre as infecções mais prevalentes em humanos nos países em desenvolvimento. Os protozoários intestinais mais comuns são: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium spp.* No que toca a parasitas helmínticos intestinais, existem quatro espécies: *Ascaris lumbricoides* (lombriga), *Trichiuris trichiuria*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanicus* ⁵⁶.

Para este teste são necessárias 3 amostras de dias consecutivos seguindo o mesmo critério de colheita de amostras de fezes para coprocultura.

Em casos de suspeita clínica de parasitose intestinal, o exame parasitológico de fezes é essencial como forma de proceder à identificação correta de ovos de helmintas, quistos ou trofozoítos de protozoários e/ou vermes. Este exame é feito através de observação microscópica. Neste tipo de exames, as técnicas mais utilizadas, que antecedem a visualização ao microscópio, são as de concentração e têm 3 objetivos principais: 1) aumentar o número de quistos, trofozoítos, ovos ou larvas na preparação; 2) eliminar a maior parte de resíduos fecais e 3) apresentar os microrganismos num estado inalterado de modo a facilitar a sua identificação ⁵⁷.

As técnicas de concentração estão divididas em dois tipos principais: flutuação e sedimentação. No CHTV recorre-se à técnica de sedimentação que utiliza uma ação reversa, ou seja, os ovos e os quistos concentram-se no fundo do tubo e a maior parte dos resíduos fecais no topo, de forma a serem removidos. As técnicas de sedimentação são recomendadas para o uso geral para o diagnóstico laboratorial, uma vez que são fáceis de executar e menos sujeitas a erros técnicos.

Na pesquisa de parasitas nas fezes tornou-se pertinente o recurso a testes rápidos para a deteção dos elementos parasitários mais comuns, *Cryptosporidium* e *Giardia intestinalis*. É utilizado um teste imunocromatográfico de fluxo lateral cuja membrana está revestida com anticorpos monoclonais contra antigénios de *Cryptosporidium* e *Giardia intestinalis*. O teste contém um controlo interno que valida o ensaio ⁵⁸.

6.5.5 Aparelho genital

No aparelho reprodutor feminino e masculino, várias doenças podem ocorrer devido a bactérias, fungos, parasitas e vírus. A maioria dessas infecções pode ser assintomática ou causar sintomas leves. Devido à grande variedade de agentes possíveis, é importante orientar corretamente a suspeita clínica para que os exames laboratoriais sejam mais precisos ⁵⁹. A colheita para as possíveis amostras é apresentada a seguir:

Aparelho genital feminino ²⁶

- Exsudado vaginal: introduzir uma zaragatoa e colher exsudado das paredes vaginais, respeitando todas as regras de assepsia (2 amostras);

- Exsudado endocervical: introduzir uma zaragatoa no endocolo, respeitando todas as regras de assepsia (2 amostras);
- Exsudado uretral: se possível antes da primeira micção, introduzir uma zaragatoa cerca de 1cm dentro da uretra, respeitando todas as regras de assepsia (2 amostras, 1 para exame direto e outra para exame cultural);
- Endométrio: Aspiração uterina através de cateter após prévia dilatação e descontaminação do cérvix;
- Abscessos: colheita cirúrgica por aspiração, respeitando todas as condições de assepsia;
- Líquido amniótico: colheita cirúrgica, respeitando todas as condições de assepsia.

Aparelho genital masculino ²⁶

- Exsudado uretral: se possível antes da primeira micção, introduzir uma zaragatoa cerca de 2cm dentro da uretra, respeitando todas as regras de assepsia (2 amostras, 1 para exame direto e outra para exame cultural);
- Epidídimo, Próstata, Testículos: colheita cirúrgica, respeitando todas as condições de assepsia.

Após semear a amostra, utiliza-se a zaragatoa para efetuar o exame direto de modo a visualizar microscopicamente a presença de *Trichomonas vaginalis* ou de elementos leveduriformes.

Na cultura, a zaragatoa é semeada diretamente no primeiro quadrante da placa e estria-se com ansa nos meios VCA3, gelose chocolate, gelose sangue e MacConkey e fazem-se lâminas para coloração de Gram.

Depois de confirmação de infecção, realiza-se uma identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

Valorização dos resultados segundo a Tabela 9 e a Tabela 10 ²⁶:

Tabela 9: Valorização de resultados na cultura de produtos provenientes do aparelho genital feminino.

Local	Microrganismos valorizados
Vulvo-vaginites	- <i>Candida albicans</i> - <i>Trichomonas vaginalis</i> - <i>Vaginose bacteriana</i> (<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mobiluncus spp.</i>) - <i>Actinomyces spp.</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus agalactiae</i>
Endocervicites	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Streptococcus. agalactiae</i> - <i>Actinomyces spp.</i>
Uretrite	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Endometrite pós-parto	- <i>Bactérias anaeróbias</i> - <i>Escherichia. coli</i> - <i>Enterococcus spp.</i> - <i>Gardenerella. vaginalis</i> - <i>Streptococcus agalactiae</i>
Trompas	- <i>Chlamydia trachomatis</i> - <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Bacteroides spp.</i>
Líquido Amniótico	- <i>Bacteroides spp.</i> - <i>Fusobacterium spp.</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Gardenerella. vaginalis</i> - <i>Streptococcus. agalactiae</i> - <i>Ureaplasma. urealyticum</i>

Tabela 10: Valorização de resultados na cultura de produtos provenientes do aparelho genital masculino.

Local	Microrganismos valorizados
Uretrite	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Prostatite	- <i>Enterobacterales</i> - <i>Pseudomonas spp.</i>
Orquite	- <i>Enterobacterales</i> - <i>Pseudomonas spp.</i>

6.5.6 Esperma

A taxa de infertilidade masculina tem crescido mais rapidamente do que a taxa de infertilidade feminina nas últimas décadas. A qualidade do esperma é um dos fatores mais importantes da infertilidade nos homens. Estilos de vida inadequados têm efeitos prejudiciais na qualidade do esperma e, conseqüentemente, na fertilidade masculina ⁶⁰.

A colheita deste produto é feita pelo próprio doente e este é transportado num frasco estéril até ao laboratório sendo depois analisada a cor, medido o volume e o pH. Ao microscópio efetua-se a contagem, em percentagem, dos espermatozoides viáveis, não viáveis, móveis, imóveis e os que apresentam deficiência de cabeça, segmento e/ou cauda.

Espermograma normal segundo a OMS ⁶¹:

- Volume $\geq 1,5$ ml
- pH ≥ 7.2
- Concentração $\geq 15 \times 10^6$ /ml
- Contagem total ≥ 40 milhões
- Mobilidade progressiva $\geq 32\%$
- Vitalidade $\geq 58\%$ vivos
- Morfologia normal $\geq 4\%$
- Leucócitos $< 1 \times 10^6$ /ml

Caso o médico solicite é levado a cabo o exame cultural do esperma (espermocultura). A sementeira é realizada sobre os meios VCA3, gelose chocolate, gelose sangue e MacConkey e fazem-se lâminas para coloração de Gram. Depois de confirmada infeção, realiza-se uma identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

6.5.7 Pus/Exsudado purulento

A formação de pus ou abscesso é uma resposta primária a infeções microbianas e danos mecânicos aos órgãos e outros tecidos. O pus é produzido por bactérias piogénicas, como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* ⁶².

Portanto qualquer método de pesquisa microbiológica de exsudado purulento deve considerar ²⁶:

1. Local da infeção
2. História clínica, nomeadamente dados epidemiológicos.
3. Tipo de infeção
4. Modo de colheita

Toda a amostra deve ser colhida para um contentor esterilizado e enviada para o laboratório. Os exsudados de lesões fechadas devem ser colhidos por punção e aspiração com agulha e seringa respeitando todas as condições de assepsia. Quanto aos exsudados de lesões abertas, quando não há possibilidade de colheita direta para o frasco por aspiração, deve utilizar-se uma zaragatoa em meio de transporte. Nos abscessos, puncionar o abscesso e enviar conteúdo purulento em meio de transporte ^{26,44}.

Chegada ao laboratório, o produto ou zaragatoa é semeado diretamente nos meios de cultura apropriados, apenas no primeiro quadrante da placa fazendo estrias com a ansa. As amostras são semeadas em gelose chocolate, gelose sangue e MacConkey e são feitas lâminas para coloração de Gram.

Depois da confirmação de infecção, realiza-se uma identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

6.5.8 Tecidos/Biópsias

A biópsia é um procedimento médico que envolve a colheita de uma pequena amostra de tecido corporal para que possa ser examinada. Uma amostra de tecido pode ser colhida de qualquer parte do corpo, incluindo órgãos e outras estruturas. Informações acerca do local da biópsia podem ser muito úteis para decidir sobre o tratamento mais adequado e para avaliar a resposta a um determinado tipo de tratamento ⁶³.

Após a colheita do produto com prévia desinfeção cirúrgica, este é colocado num contentor estéril e enviado ao laboratório. No laboratório, corta-se o tecido com um bisturi de modo a obter um pequeno fragmento para semear em gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey, fazendo também lâminas para coloração de Gram e lâminas para coloração de Ziehl. Retira-se outro fragmento para um tubo esterilizado e adicionam-se 400µL de tampão de digestão G2 (QIAGEN) para efetuar PCR de modo a pesquisar a presença de micobactérias. Retira-se, ainda, mais um pedacinho para um frasco de MGIT (procedimento exposto na secção 6.1). Ao restante tecido adiciona-se meio de enriquecimento BHI e passado 24h semeia-se nas mesmas placas referidas anteriormente ^{26,44}.

Depois de confirmação de infecção, realiza-se uma identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

6.5.9 BÍLIS

A bÍlis é um fluido digestivo produzido pelo fÍgado. É armazenado e concentrado na vesÍcula biliar. A sua principal função é converter as gorduras dos alimentos em ácidos gordos, que são absorvidos no intestino. As funções importantes da bÍlis são ⁶⁴:

- Digestão completa das gorduras, proteínas e hidratos de carbono;
- Auxilia na absorção de várias substâncias. Isso também se deve à presença de sais biliares;

- Excreção de metais e toxinas;
- Ajuda a manter um pH adequado do conteúdo duodenal e, portanto, auxilia na ação de todas as enzimas.

Este produto quando chega ao laboratório é semeado por estrias, em gelose sangue, gelose chocolate, MacConkey e SS e o restante produto divide-se para meio de enriquecimento BHI e para meio de enriquecimento GN e no dia seguinte semeia-se a partir dos meios líquidos nos meios sólidos respetivos, GN para SS passadas 6-12 horas e BHI para gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey passadas 24 horas. Fazem-se também lâminas para coloração de Gram.

Depois de confirmação de infecção, realiza-se uma identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

6.5.10 Exsudado Nasal e Axilar

O agar chromID® MRSA (BioMérieux) é um meio cromogéneo utilizado neste laboratório para a seleção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em portadores crónicos de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (SAMR, ou MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) ⁶⁵.

MRSA são bactérias multirresistentes (MDR) que podem causar infeções nosocomiais, por isso a deteção de portadores de MRSA é particularmente importante para a prevenção e monitorização epidemiológica dessas infeções. Este meio de cultura consiste numa base rica em nutrientes combinando diferentes peptonas. Também contém um substrato cromogéneo de α -glucosidase e uma combinação de vários antibióticos, incluindo cefoxitina, que favorecem ⁶⁵:

- o crescimento de MRSA, incluindo estirpes heterorresistentes;
- a deteção direta de estirpes de MRSA, revelando a atividade da α -glucosidase: colónias verde-azuladas.

A mistura seletiva inibe o crescimento da maioria das bactérias não pertencentes ao género *Staphylococcus*, assim como as leveduras ⁶⁵.

A colheita destas amostras deve ser realizada com uma zaragatoa nos locais indicados (fossas nasais e axilas). Chegado ao laboratório semeia-se as respetivas zaragatoas diretamente no meio seletivo MRSA. Incuba-se 18-24h numa estufa a 37°C. Não se efetua a leitura de resultados após esse tempo, pois outras colónias alteram a sua coloração para verde-azulado dando origem a falsos positivos.

6.5.11 Exsudado Vaginal e/ou Retal (grávidas)

Streptococcus β -hemolíticos do Grupo B ou *Streptococcus agalactiae* são diplococos Gram-positivos que são normalmente assintomáticos em adultos. No entanto, nos recém-nascidos podem acarretar graves problemas de saúde tais como septicémia, pneumonia e meningite,

podendo mesmo ser mortais. Logo, é fundamental identificar mulheres grávidas portadoras de *Streptococcus* do Grupo B no trato genital. A administração de antibióticos *intrapartum* pode diminuir drasticamente a potencial transmissão da doença para o bebé ⁶⁶.

O meio Granada (BioMérieux) contém uma base nutritiva, metotrexato, soro de cavalo e amido que permitem a produção de um pigmento de cor laranja avermelhado característico das colónias de *Streptococcus* do Grupo B. Contém também uma mistura de antibióticos que inibem a maioria das bactérias e leveduras ⁶⁶.

Após a colheita da amostra por zaragatoa, na vagina e/ou reto, transporta-se para o laboratório onde é semeada diretamente em 3 direções diferentes, no meio seletivo Granada de modo a contar as colónias. Incuba-se de 18-24h numa estufa de 37°C. Não se efetua a leitura de resultados após esse tempo, pois outras colónias alteram a sua coloração para laranja avermelhado dando origem a falsos positivos.

6.5.12 Líquidos estéreis

Os líquidos orgânicos que chegam ao laboratório são normalmente amostras de líquido pleural, peritoneal, pericárdico ou sinovial para cultura bacteriológica. Estes são geralmente estéreis, por isso qualquer microrganismo encontrado deve ser considerado. ²⁶.

Para colheita destes líquidos, é recomendado um volume mínimo de 1 mL e no caso de pesquisa de micobactérias ou fungos é necessário um volume maior de 10 a 20 mL. Deve ser colhido para um frasco esterilizado (também pode ser inoculado num frasco de hemocultura) e enviado ao laboratório onde é primeiramente centrifugado, de modo a concentrar os microrganismos num sedimento (*pellet*). Contudo, quando há pouca quantidade de líquido ou quando este é muito purulento não é necessário centrifugar. O sobrenadante é rejeitado e o *pellet* semeado nos meios gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey, pelo método de estrias, e fazem-se lâminas para coloração de Gram. O sedimento remanescente é colocado em meio de enriquecimento BHI e passado 24h semeia-se nos mesmos meios. Excepcionalmente, o líquido cefalorraquidiano (LCR) apenas se semeia em gelose sangue, gelose chocolate e posteriormente BHI seguindo o mesmo procedimento ²⁶. Neste tipo de produto também se efetua todo o procedimento do MGIT referido atrás na secção 6.1.

Depois de confirmação de infeção, realiza-se uma identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

6.5.12.1 Líquido Cefalorraquidiano

A meningite é uma infeção grave das meninges, as membranas que cobrem o cérebro e a medula espinhal. É uma doença que continua a ser um grande desafio para a saúde pública. A doença pode ser causada por muitos patógenos diferentes, incluindo bactérias, fungos ou vírus, mas a mais prevalente a nível global é a meningite bacteriana ⁶⁷.

Várias bactérias diferentes podem causar meningite, sendo as mais frequentes *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* ⁶⁷.

O diagnóstico definitivo requer a colheita do LCR por punção lombar. O diagnóstico laboratorial é uma emergência médica que exige o processamento imediato do produto para identificar o agente etiológico. Geralmente são as bactérias aeróbias que causam esta infecção, mas na presença de abscesso cerebral o agente etiológico pode ser uma bactéria anaeróbia ²⁶. Na Tabela 11 encontram-se todos os microrganismos que devem ser avaliados neste produto biológico, dependendo da idade ²⁶.

Tabela 11: Microrganismos a considerar no LCR, conforme a idade.

Idade ou condição	Microrganismos
Recém-nascidos	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Herpes simplex virus 2</i>
< 2 meses	<i>S. agalactiae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>
< 10 anos	<i>Virus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>
Adultos jovens	<i>Virus</i> , <i>N. meningitidis</i>
Adultos	<i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i>
Idosos	<i>S. pneumoniae</i> , Bacilos Gram negativo, <i>L. monocytogenes</i>
Doentes imunocomprometidos	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Volumes mínimos de colheita recomendados:

- 1 mL para exame bacteriológico
- 2 mL para cultura de fungos
- 3 mL para cultura de micobactéria

A colheita deve ser feita por punção lombar, antes de se iniciar a terapêutica antimicrobiana, e o LCR deve ser colhido em tubos inquebráveis, transparentes, com tampa de rosca e fundo cônico para concentração do produto, uma vez que pode conter muito poucas bactérias. É recomendada a colheita em três tubos, que devem ser numerados, sendo o último, utilizado para o exame microbiológico. O processamento deste líquido em laboratório é semelhante aos outros líquidos, com exceção dos meios a semear, como já referido anteriormente ^{26,44}. Além da cultura, a amostra de LCR também é separada para análise bioquímica (glicose e proteínas), para exame direto e para execução de um teste de biologia molecular rápido, que permite a detecção de vários microrganismos, FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel (BioMérieux), que pesquisa os microrganismos: *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Citomegalovírus*, *Enterovirus*, Herpes-virus Simples (1,2 e 6), *Human Parechovirus*, *Varicela Zóster* e *Cryptococcus neoformans*.

6.5.13 Aparelho respiratório

As infeções respiratórias surgem quando uma parte do aparelho respiratório é infetada por um microrganismo podendo ser um vírus, uma bactéria, um fungo ou um parasita. Infeções do trato respiratório são comuns e talvez as mais frequentemente relatadas em seres humanos ⁶⁸. O trato respiratório divide-se em inferior e superior, no entanto neste relatório, apenas será referido o inferior, pois foi o único com que tive contacto.

O diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório apenas deve processar amostras de boa qualidade. As amostras pertencentes ao trato respiratório inferior e o seu modo de colheita estão presentes na Tabela 12 ²⁶:

Tabela 12: Modo de colheita dos diferentes produtos do aparelho respiratório.

Tipo de amostra	Modo de colheita
Expetoração	Se possível a primeira da manhã, lavar a boca previamente com água. Instruir o doente para obter expetoração por tosse profunda. Colocar a amostra num frasco esterilizado.
Expetoração induzida	Indução de expetoração por nebulização com soro fisiológico ou por cinesiterapia respiratória. Colocar a amostra num frasco esterilizado.
Secreções brônquicas	Através de aspiração endotraqueal. Aspirar as secreções e colocar em recipiente seco, estéril.
Lavado brônquico	Colhidas por broncoscopia. Enviar as amostras ao laboratório em recipientes secos, estéreis. Efetuar 3 amostras devidamente identificadas.
Lavado bronco-alveolar	Colhidas por broncoscopia. Enviar as amostras ao laboratório em recipientes secos, estéreis. Efetuar 3 amostras devidamente identificadas.
Escovado brônquico	Colhidas por broncoscopia. Colocar o escovado num recipiente esterilizado com 1mL de soro fisiológico estéril
Biópsia brônquica	Colhidas por broncoscopia. Colocar em recipiente esterilizado.
Aspirado transtraqueal	Primeiramente desinfeção correta da pele no local da punção, aplicar anestesia local e colher por aspiração. Colocar a amostra num recipiente esterilizado.
Biópsia pulmonar	Se possível colher 1 a 3 mm ³ de tecido pulmonar, se a lesão for de grandes dimensões ou múltipla, colher várias amostras. Colocar num recipiente seco e esterilizado e enviar para o laboratório o mais rápido possível.

As amostras mais frequentes são expetoração, aspirado e lavado brônquico. O seu processamento está descrito em seguida.

Para todas as amostras respiratórias pode ser avaliada a presença de *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecida por bacilo de Koch (BK), pela metodologia de PCR e através da cultura utilizando o sistema BD BACTEC MGIT (Quilaban) referido anteriormente na secção 6.1.

A tuberculose é uma doença contagiosa causada pela presença da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* que afeta principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar) mas também pode afetar outros órgãos (tuberculose extrapulmonar). Os métodos de PCR apresentam uma sensibilidade em torno de 50% e especificidade de cerca de 100% ⁶⁹. Para realizar esta técnica é utilizado o GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid), que funciona como uma ferramenta rápida para o diagnóstico da tuberculose. Este teste também permite avaliar a resistência ao antibacilar rifampicina ⁷⁰.

Tal como no LCR, também existe um teste rápido, que permite a deteção de vários microrganismos, Painel Respiratório FilmArray® (BioMérieux), que possibilita a pesquisa dos microrganismos: Adenovirus, Coronavírus humano 229E, HKU1, NL63, OC43, Metapneumovirus, Rhinovirus, Enterovirus, Influenza A e B, MERS-CoV, *Parainfluenza* 1, 2, 3 e 4, Vírus Sincicial Respiratório, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

A etiologia e sintomatologia respiratória da doença varia com a idade, sexo, estação do ano, tipo de população em risco, entre outros fatores. As principais bactérias patogénicas isoladas no trato respiratório inferior são ^{68,71}:

- *Staphylococcus aureus*- colónias grandes que apresentam β -hemólise em gelose sangue e de cor amarelada em gelose chocolate com cheiro característico desagradável em ambas, cocos Gram-positivo em cacho ou em tétada na coloração de Gram. Na presença de colónias suspeitas faz-se o teste da catalase e da coagulase e se ambos forem positivos efetua-se a confirmação e o respetivo antibiograma no VITEK® 2 (BioMérieux).
- *Streptococcus pneumoniae*- colónias invaginadas e que contém α -hemólise no meio gelose sangue acompanhadas de diplococos Gram-positivo na coloração de Gram. No caso de colónias suspeitas, testa-se a sensibilidade à optoquina, se for sensível efetua-se a confirmação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

- *Moraxella catarrhalis*- colónias com coloração rosada/bege. São diplococos Gram-negativo, oxidase e catalase positivas, que será confirmado através da identificação do microrganismo no aparelho VITEK® 2 (BioMérieux) e respetivo antibiograma manualmente.
- *Haemophilus influenzae*- são colónias pequenas e brancas em gelose chocolate e não têm crescimento em gelose sangue. Na coloração de Gram apresentam-se como cocobacilos ou bacilos Gram negativos. Na presença de colónias suspeitas faz-se a identificação do microrganismo no aparelho VITEK® 2 (BioMérieux) e o respetivo antibiograma manualmente.
- *Pseudomonas spp.*- colónias grandes com brilho metálico em gelose chocolate e com cheiro agradável a sabão em ambos os meios. Bacilos Gram negativos, catalase positiva e oxidase positiva. Para confirmar procede-se à identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).
- *Acinetobacter*- diplococos Gram negativos, oxidase negativa e catalase positiva. Para confirmação faz-se identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).
- *Klebsiella spp.*- bacilos Gram negativos, oxidase negativa e catalase positiva. Para confirmação faz-se a identificação do microrganismo e o respetivo antibiograma através do aparelho VITEK® 2 (BioMérieux).

6.5.13.1 Expetoração

Antes de efetuar a cultura, fazem-se lâminas para coloração de Gram de modo a verificar se a amostra é representativa do trato respiratório inferior e não está contaminada pela flora da orofaringe. Sendo assim, seleciona-se uma porção purulenta da amostra, para observar ao microscópio ótico, a fim de avaliar a qualidade da amostra tendo em conta a presença de células epiteliais pavimentosas (da orofaringe) e leucócitos. As amostras classificam-se segundo o critério de Murray e Washington, presentes na Tabela 13 ²⁶:

Tabela 13: Classificação das amostras de expetoração, segundo o critério de Murray e Washington.

	Células Epiteliais pavimentosas	Leucócitos	Qualidade da amostra
Grupo 1	25	10	Má para exame bacteriológico
Grupo 2	25	10-25	Má para exame bacteriológico
Grupo 3	25	25	Má para exame bacteriológico
Grupo 4	10-25	25	Boa para exame bacteriológico
Grupo 5	<10	25	Boa para exame bacteriológico

Para cultura, semeia-se com ansa por estrias, em meio gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey. No caso de pedir pesquisa de BK, fazem-se também lâminas para coloração de Ziehl-Neelsen para exame direto e transfere-se a restante expetoração para um tubo estéril com volume máximo de 10mL para efetuar a descontaminação previamente à entrada no BD BACTEC MGIT (Quilaban).

6.5.13.2 Aspirado Brônquico

Normalmente acompanhado pelo lavado brônquico. Para efetuar a cultura por estrias, semeia-se em gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey e fazem-se lâminas para coloração de Gram e para coloração de Ziehl-Neelsen a fim de pesquisar diretamente a presença de BK. Transfere-se uma parte para um tubo esterilizado de modo a efetuar PCR utilizando o teste GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid) e outra parte para cultura em meio líquido pelo meio MGIT.

6.5.13.3 Lavado Brônquico

O lavado brônquico normalmente é acompanhado pelo aspirado brônquico. Procede-se à cultura pelo método de estrias, em meio gelose sangue, gelose chocolate e MacConkey. Fazem-se lâminas para coloração de Gram e para coloração de Ziehl-Neelsen de modo a pesquisar diretamente a presença de BK. Transfere-se uma parte para um tubo esterilizado de modo a efetuar PCR (cartucho do GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid)) outra parte para pesquisa de BK pelo meio MGIT.

- Em todos os produtos que é necessário efetuar cultura pode ser pedido exame micológico, sendo a mostra semeada em meio Sabouraud-Gentamicina-Cloranfeicol.

7. Laboratório de Serologia

A serologia pode ser definida como o estudo do soro, com a finalidade de pesquisar agentes causadores de doenças transmitidas através do sangue. A serologia tem sido usada para confirmar infecções por bactérias, fungos e vírus que são difíceis de detetar por outros métodos. Algumas dificuldades prendem-se por exemplo com os doentes imunocomprometidos, por estes não apresentarem uma resposta adequada de anticorpos perante uma infeção. Um aumento significativo no título de anticorpos pode não ser detetado até semanas ou meses após a apresentação inicial. Por outro lado, a persistência de anticorpos pode dificultar a diferenciação entre uma infeção recente ou passada, e as reações cruzadas podem comprometer a especificidade da resposta do anticorpo²⁸.

A quantificação das imunoglobulinas é útil no diagnóstico de vários distúrbios hepáticos e para a monitorização da resposta a terapêuticas de substituição. Concentrações plasmáticas elevadas geralmente indicam um processo inflamatório subjacente. A imunoglobulina G (IgG) é o anticorpo mais abundante em circulação e é produzida em respostas imunes secundárias sendo vital para a memória imunológica. A imunoglobulina A (IgA) é a principal imunoglobulina das secreções mucosas e também é produzida em respostas imunitárias secundárias. Já a imunoglobulina M (IgM) é o anticorpo da resposta imune primária, culminando no processo de mudança de classe, que induz as células B a produzirem os anticorpos IgG ou IgA, característicos da resposta secundária. Portanto, a IgM fornece a primeira linha de defesa durante infeções virais, antes da geração de respostas adaptativas de IgG de alta afinidade que são importantes para imunidade de longo prazo e memória imunológica^{4,72}.

Os testes realizados nesta secção são os seguintes:

- **Reação Wright-** O serodiagnóstico de Wright permite efetuar o diagnóstico serológico das formas agudas de brucelose. Este teste quantitativo torna-se positivo muito precocemente, a partir do 10^o ou 12^o dia, na forma aguda da brucelose, mas passa rapidamente a negativo porque deteta as IgM. Não é recomendável para rastreios epidemiológicos, nem para o diagnóstico da brucelose crónica. O serodiagnóstico de Wright é uma reação de aglutinação que utiliza, como antigénio, uma suspensão de *Brucella*, inativadas por formol e pelo calor. Um resultado superior ou igual a 1/80 (120 U.I./mL) indica uma brucelose ativa⁷³.
- **Rosa Bengala-** A reação ao antigénio corado de Rosa Bengala permite o diagnóstico serológico das bruceloses provocadas por *Brucella melitensis*, *Brucella*

abortus, *Brucella bovis* ou *Brucella suis*, por detecção de IgG. É um teste qualitativo que consiste numa reação de aglutinação rápida que utiliza, como suspensão bacteriana, *Brucella abortus*, corada de Rosa Bengala em meio ácido tamponado. Após mistura em partes iguais do antígeno Rosa Bengala e de soro, observa-se o aparecimento de aglutinados corados em caso de brucelose positiva ⁷⁴.

- **Reação de Widal**- O teste de Widal é um teste de aglutinação utilizado para o diagnóstico de febre entérica (febre tifoide ou paratifoide). Estes testes medem o nível de anticorpos séricos que aglutinam contra o antígeno O (somático) e H (flagelar) de *Salmonella Typhi* e *Paratyphi A*, B e C. Este teste é baseado no princípio de uma reação de aglutinação antígeno-anticorpo. Antígenos purificados de *Salmonella* que causam febres entéricas estão comercialmente disponíveis. O soro do doente é testado contra esses antígenos comerciais e observado quanto à reação de aglutinação visível. Se o soro aglutinar, o teste é considerado positivo. A *Salmonella Typhi* contém antígenos O e H na parede celular e flagelos, respetivamente. A *Salmonella Paratyphi A* e *Paratyphi B* contêm antígenos AH e BH nos flagelos, respetivamente ⁷⁵.

- **Sífilis** - Uma vez que não é possível cultivar os microrganismos *Treponema pallidum* nos meios de cultura artificiais, o laboratório recorre à pesquisa de anticorpos: (1) anticorpos não-treponemais (reaginas) dirigidos contra os antígenos lipídicos das células hospedeiras danificadas ou talvez dos próprios treponemas e (2) anticorpos anti-treponemais, que são dirigidos aos antígenos de superfície de *T. pallidum*.

O ensaio dos anticorpos não-treponemais efetuado é o teste rápido da reagina plasmática (RPR). O teste RPR qualitativo compreende um ensaio de triagem, no qual o soro não diluído do doente é misturado a partículas de carvão revestidas com cardiolipina numa lâmina. Após a rotação mecânica por um período especificado pelo fabricante, o teste é examinado por aglutinação macroscópica das partículas de carvão. Para a realização do teste RPR quantitativo, são preparadas diluições seriadas do soro do doente e o resultado é interpretado pela maior diluição do soro do doente que aglutina as partículas de carvão ⁷⁶.

A pesquisa dos anticorpos anti-treponemais é efetuada utilizando o teste de microhemaglutinação do *T. pallidum*. Este teste é realizado em placas de microtitulação. Eritrócitos de carneiro sensibilizados com antígenos de *T. pallidum* são misturados ao soro do doente. Depois da incubação adequada, a aglutinação dos

eritrócitos é pesquisada na placa de microtitulação. O resultado positivo é dado pela hemaglutinação dos eritrócitos sensibilizados e ausência da aglutinação dos eritrócitos não sensibilizados ⁷⁶.

A serologia viral possui duas aplicações principais: diagnóstico de infecção recente e determinação da imunidade. Como a solicitação destes testes excede a capacidade do sector da serologia são executados nos equipamentos automatizados existentes no laboratório central e de imunologia

8. Laboratório de Hematologia

A hematologia é a especialidade que engloba o estudo das células sanguíneas e da coagulação. Envolve o estudo de concentração, estrutura e função das células presentes no sangue, dos seus precursores na medula óssea e dos constituintes bioquímicos do plasma que estão intimamente ligados à estrutura e função das células sanguíneas, bem como da função das plaquetas e proteínas envolvidas no processo de coagulação do sangue. Portanto, com todos estes parâmetros referidos, estuda várias doenças, nomeadamente anemias, leucemias, linfomas, e alterações no processo de coagulação ¹.

Durante os últimos 40 anos, o mundo da hematologia laboratorial experimentou uma expansão e diversificação sem precedentes. Juntamente com os surpreendentes desenvolvimentos em biologia molecular, análise imunofenotípica e hemostasia-coagulação, a análise hemocitométrica também teve uma evolução imprevisível das tecnologias. Essa explosão transformou as contagens celulares num estudo aprofundado, dentro do curto espaço de tempo utilizado para um hemograma completo, de muitas características celulares. A disponibilidade de tecnologias inovadoras introduzidas em analisadores automáticos de hematologia levou a melhor desempenho e estendeu as suas aplicações para campos de diagnóstico paralelos ⁷⁷.

Na secção de hematologia do CHTV efetuam-se hemogramas, análise da velocidade de sedimentação eritrocitária (VS), contagem de reticulócitos, contagem total e diferencial de células em líquidos estéreis (pleurais, peritoneais e outros), esfregaços de sangue periférico, contagem diferencial dos elementos celulares da medula óssea e imunofenotipagem por citometria de fluxo em doentes com o vírus da imunodeficiência humana (VIH).

No início de cada dia são passados controlos em todos os equipamentos, verifica-se o material e reagentes e são efetuadas as manutenções e lavagens necessárias.

Além dos líquidos e urinas que possam entrar nesta secção, as amostras mais frequentes são sangue total colhido em tubos de K₃EDTA para análise de todos os parâmetros presentes, à exceção de fatores de coagulação que têm de ser realizados em plasma centrifugado, a partir de um tubo de citrato de sódio (Tabela 2).

8.1 Hematopoiese

A hematopoiese consiste na formação das células sanguíneas. Processa-se na medula óssea, a partir de células estaminais pluripotentes. As células estaminais conduzem à formação de células progenitoras que, após divisão e diferenciação, formam eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, plaquetas e linfócitos B e T ⁷⁸.

A hematopoiese é um processo contínuo pelo qual as células sanguíneas são produzidas, mantidas em níveis normais e aumentadas em resposta a um estímulo. HSC (célula-tronco hematopoiéticas) têm 3 propriedades críticas: diferenciação em progenitores de todas as linhagens; alta capacidade proliferativa, como progenitora dando origem a milhares de células sanguíneas maduras; e autorrenovação para manter o reservatório de HSC. O progenitor mieloide primitivo é responsável pela produção de granulócitos, células eritroides (precursores de glóbulos vermelhos) e megacariócitos (precursores de plaquetas) e o progenitor linfóide pela produção de linfócitos. O estroma da medula, a vasculatura e as citocinas do ambiente da medula desempenham um papel de regulação e mantêm a hematopoiese, contribuindo para a autorrenovação e diferenciação das células ⁷⁹ (Figura 16).

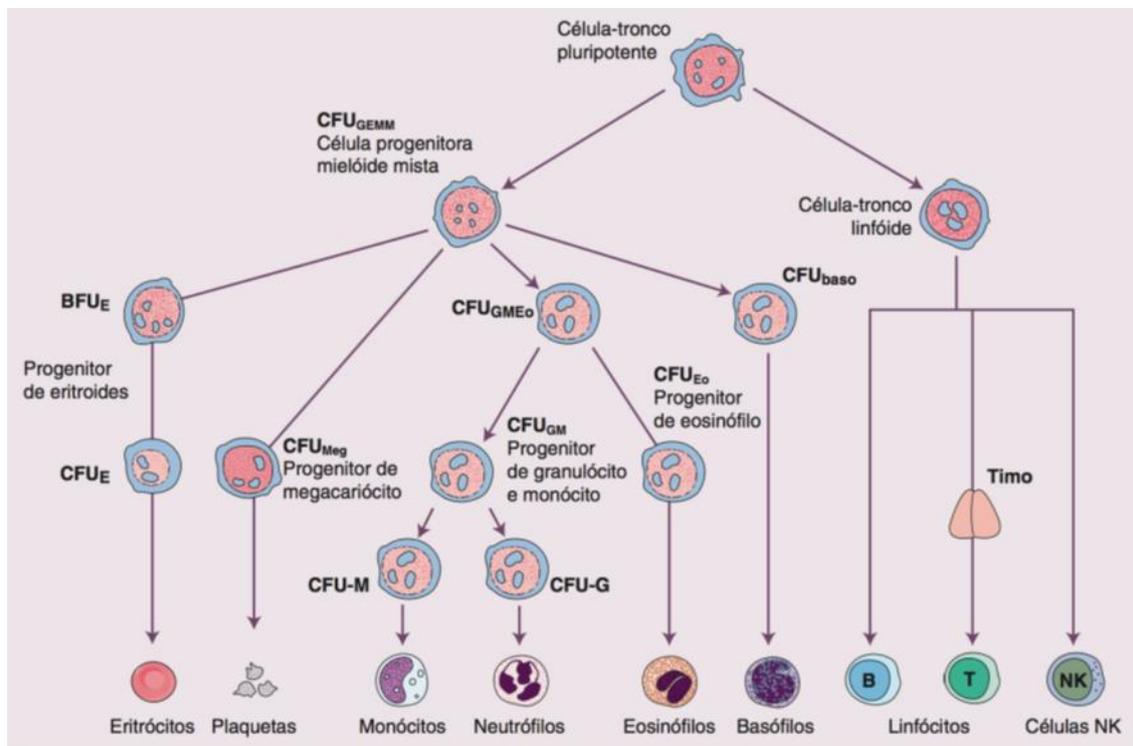


Figura 16: Figura representativa da Hematopoiese ⁷⁸. Baso: basófilo; BFU: unidade formadora explosiva; CFU: unidade formadora de colônia; E: eritroide; Eo: eosinófila; GEMM: granulocítica, eritroide, monocítica e megacariocítica; GM: granulócito, monócito; Meg: megacariócito; NK: *natural killer*.

À medida que os humanos envelhecem, ocorrem muitas alterações na medula óssea, que podem ter consequências clínicas. Diferenças na medula entre jovens e idosos foram demonstradas em modelos animais e em humanos, envolvendo alterações no número total de células, senescência, diferenciação de linhagens, composição celular e função da HSC. Essas alterações provavelmente contribuem para uma maior taxa de citopenias, predominantemente anemia e linfopenia, e risco de malignidade hematológica ⁷⁹.

8.2 Hemograma

O exame de sangue mais comumente realizado é a contagem completa de células sanguíneas. O hemograma inclui o valor de hemoglobina, contagem de glóbulos brancos, contagem de plaquetas e índices detalhados de glóbulos vermelhos. Este teste é necessário no diagnóstico de anemias, cânceres hematológicos, infecções, estados hemorrágicos agudos e imunodeficiências. Também é usado para monitorizar os efeitos colaterais de certos medicamentos ⁸⁰.

Portanto, o hemograma representa um conjunto de parâmetros laboratoriais que oferecem informações sobre os eritrócitos (eritrograma), sobre os leucócitos (leucograma) e sobre as plaquetas (plaquetograma) presentes no sangue.

O laboratório de hematologia do CHTV utiliza o analisador hematológico DxH 600 (Beckman Coulter) (Figura 17) que usa uma tecnologia multidimensional de alta-definição para caracterizar células individuais, permitindo assim uma contagem de células necessárias à realização de um hemograma ⁸¹ (Figura 18). A técnica usada neste aparelho tem o nome de “Princípio de Coulter” e consiste na contagem e determinação da dimensão das células, através da detecção e medição das alterações na resistência elétrica, sempre que uma partícula presente num líquido condutor atravessa uma pequena abertura, criando uma resistência. Quanto maior a partícula, maior a resistência, maior a voltagem. Enquanto o número de impulsos indica a contagem das partículas, o tamanho do impulso elétrico será proporcional ao volume celular ⁸². As células sanguíneas não são condutoras de eletricidade, portanto, quando um conjunto de células num meio condutor passa por uma pequena abertura pela qual circula uma corrente elétrica, há um aumento mensurável da impedância elétrica na abertura, à medida que passa cada célula. Esse aumento é proporcional ao volume de material condutor deslocado e, portanto, ao volume celular. Assim, são contabilizadas e medidas as células a partir dos impulsos elétricos gerados. Os instrumentos Coulter contam e medem os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas pela tecnologia de impedância ²⁰.



Figura 17: Analisador hematológico DxH 600 (Beckman Coulter) utilizado no laboratório de hematologia do CHTV.

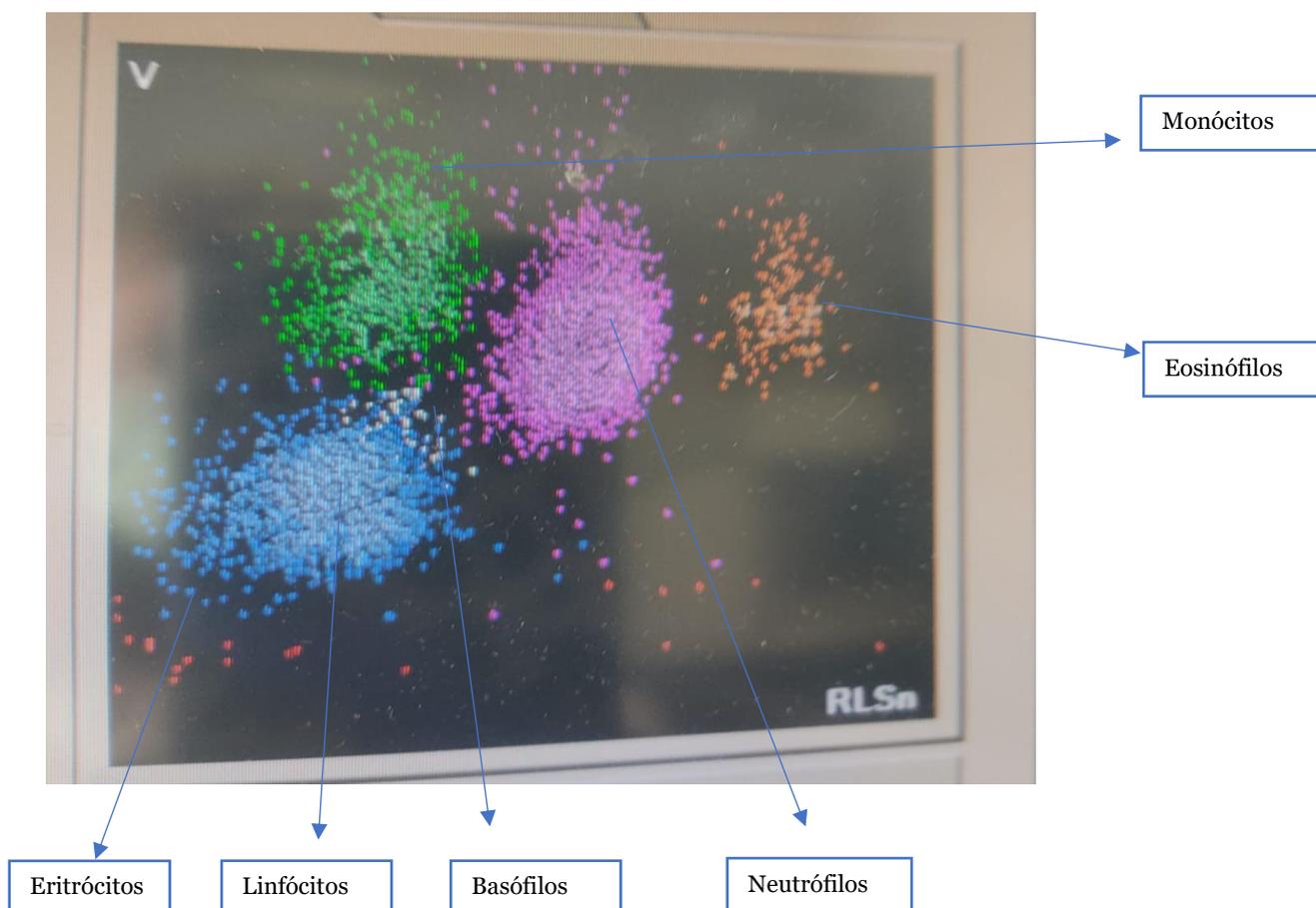


Figura 18: Gráfico representativo de uma distribuição celular normal, exibida pelo aparelho Beckman Coulter DxH 600.

8.2.1 Eritrograma

O eritrograma é a parte do hemograma que estuda a linhagem vermelha do sangue periférico (eritrócitos). É constituído pela contagem de eritrócitos, pela quantificação de hemoglobina, análise do hematócrito, cálculo dos índices hematimétricos que incluem: o Volume Corpuscular Médio (VCM), a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), a Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e a Amplitude da Variação do Volume dos Eritrócitos (RDW).

8.2.1.1 Eritrócitos

A maioria dos eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos) (Figura 19) normais têm formato de disco bicôncavo com diâmetro médio de cerca de 7,5 μm . O formato e a flexibilidade normais do eritrócito dependem da integridade do citoesqueleto ao qual está ligada a membrana lipídica. O aparecimento de formatos anómalos pode resultar de um defeito primário do citoesqueleto ou da membrana, ou decorrer de fragmentação eritrocítica ou de polimerização, cristalização ou precipitação da hemoglobina. Estas células são especializadas no transporte de oxigénio dos pulmões aos tecidos e do CO_2 no sentido inverso. Apresentam um tempo de vida médio de 120 dias, sendo posteriormente fagocitados pelo RE (retículo endoplasmático) ²⁰.

A membrana do eritrócito é constituída por uma dupla camada lipídica, atravessada por várias proteínas transmembranares, sendo as mais importantes a Proteína 3 e as Glicoforinas. Para descrever as células normais, são utilizadas as seguintes nomenclaturas: 1) normocítico, que significa que as células têm um tamanho dentro da normalidade e 2) normocrómico, que significa que as células contêm uma quantidade e uma concentração de hemoglobina dentro da normalidade ²⁰. Esta nomenclatura é útil para classificar o tipo de anemia, no caso de esta estar presente.

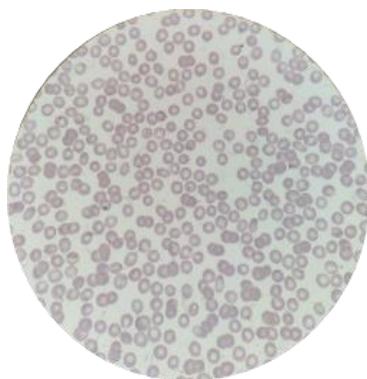


Figura 19: Eritrócitos visualizados ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.

8.2.1.2 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é o principal componente dos eritrócitos, é uma proteína conjugada que tem como função primária transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos, ligando e libertando O_2 ¹. Na maioria dos vertebrados, a Hb é um tetrâmero, constituído por duas subunidades α (α_1 e α_2) e duas subunidades β (β_1 e β_2) que são estruturalmente semelhantes e aproximadamente do mesmo tamanho. Portanto, uma molécula de Hb é constituída por dois pares de cadeias polipeptídicas e quatro grupos prostéticos heme, cada com um átomo de ferro ferroso. A Hb reduzida é aquela em que o ferro não está associado ao oxigênio. Quando cada grupo heme está associado a uma molécula de oxigênio, a Hb é denominada de oxi-hemoglobina (HbO_2). Quando o ferro é oxidado ao estado férrico, há formação de meta-hemoglobina e a molécula perde a capacidade de transportar oxigênio e dióxido de carbono^{1,83}.

A estimativa correta da Hb é importante, pois constitui um dos testes de rotina importante para o diagnóstico de anemias, classificando-se de acordo com a nomenclatura referida na subsecção anterior.

8.2.1.3 Hematócrito

Os eritrócitos ocupam 40-48% do volume de sangue num adulto saudável. A fração volumétrica de eritrócitos é chamada de hematócrito (Hct) e é um dos parâmetros descritos num hemograma. Trata-se da proporção do volume de eritrócitos em relação ao volume total de sangue. É expresso tanto em percentagem como em L/L. As medições do Hct podem ser solicitadas quando há suspeita de que um doente está anémico ou sofre de desidratação, perda de sangue ou outras condições médicas e cirúrgicas^{1,84}.

8.2.1.4 Índices Hematimétricos

Wintrobe introduziu cálculos para determinação do tamanho, conteúdo e concentração de Hb dos eritrócitos. Esses índices hematimétricos são vantajosos para a caracterização morfológica das anemias. Podem ser calculados a partir da contagem dos eritrócitos, da concentração de Hb e do Hct¹.

- VCM

Este parâmetro corresponde ao volume médio dos eritrócitos, expresso em fentolitros. É um parâmetro muito útil para a classificação das anemias, pois está relacionado com alterações no tamanho dos glóbulos vermelhos. A anemia classifica-se como normocítica quando os valores de VCM se encontram dentro dos valores de referência (82-98fl), como macrocítica quando os valores de VCM são superiores a 98fL (eritrócitos macrocíticos) e como microcítica quando o valor é inferior a 82fL

(eritrócitos microcíticos). É determinado automaticamente pelos aparelhos, mas pode também ser calculado a partir da fórmula ^{1,20}:

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

- HCM

Este parâmetro fornece informações acerca do conteúdo (peso) médio de Hb nos eritrócitos, sendo calculado a partir da concentração de Hb e da contagem de glóbulos vermelhos. O valor é expresso em picogramas ^{1,20}.

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

- CHCM

Este índice hematimétrico corresponde à concentração média de Hb presente num dado volume de eritrócitos concentrados e é expresso em g/dL. É calculado a partir da concentração de Hb e do Hct. Também é um parâmetro usado na classificação das anemias. Identificam-nas morfológicamente, como normocrômicas quando os valores de CHCM se encontram dentro dos valores de referência (32-35g/dL), ou hipocrômicas, para valores inferiores a 32g/dL (eritrócitos hipocrômicos) ^{1,20}.

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

8.2.1.5 RDW

A amplitude da variação do volume dos eritrócitos ou índice de anisocitose é um parâmetro que auxilia a classificação de uma anemia. É um parâmetro simples que reflete o grau de heterogeneidade do volume eritrocitário (convencionalmente conhecido como anisocitose) ^{1,85}.

Um aumento do RDW reflete uma profunda desregulação da homeostase dos eritrócitos envolvendo tanto a eritropoiese como o metabolismo e a sobrevivência anormais dos eritrócitos, o que pode ser causado por uma variedade de anomalias, a saber, encurtamento do comprimento dos telómeros, stress oxidativo, inflamação, fragmentação eritrocitária, deficiente estado nutricional, hipertensão, dislipidemia e alteração da função da eritropoietina ⁸⁵.

8.2.1.6 Reticulócitos

Os eritrócitos em mamíferos são derivados de progenitores megacariócitos eritróides (MEPs). Das células precursoras até às células maduras diferenciadas ocorrem uma série de etapas de maturação chamadas coletivamente de eritropoiese terminal e podem ser seguidas morfológicamente. As células imaturas que antecedem o reticulócito, são cronologicamente o pró-eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático e o eritroblasto ortocromático. Durante a eritropoiese terminal, o núcleo é progressivamente condensado e no eritroblasto ortocromático é expulso para fora do citoplasma, originando a última célula imatura desta linhagem, o reticulócito ⁸⁶. Portanto, os reticulócitos são eritrócitos jovens, recém-libertados pela medula óssea e que ainda contêm RNA ribossômico. Os reticulócitos permanecem na medula óssea de 24 a 48 horas antes de serem libertados para a corrente sanguínea. Fornecem uma medida quantitativa da eritropoiese no quadro de anemia, apesar de não fornecerem informações relativamente à sua qualidade, permitindo apenas a distinção entre anemias hipoproliferativas (diminuição da produção) e anemias hiperproliferativas (aumento da perda ou destruição) ²⁰.

O método de medição dos reticulócitos faz-se através do corante azul-de-metileno ou azul de cresil brilhante, pois ativa e agrega substâncias basofílicas dentro dos reticulócitos, resultando num padrão de coloração granular de fácil visualização microscópica.

8.2.2 Leucograma

O leucograma é a parte do hemograma que se destina ao estudo da linhagem branca do sangue periférico (leucócitos). É constituído pela contagem global e pela contagem diferencial dos glóbulos brancos. O resultado é expresso sob a fórmula leucocitária (valores relativos e absolutos) de cada subtipo leucocitário, sendo eles: Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Basófilos.

8.2.2.1 Leucócitos

Os leucócitos (Glóbulos Brancos) do sangue periférico normal são células esféricas que podem ser classificadas como polimorfonucleares e mononucleares; o último termo inclui linfócitos e monócitos. Os leucócitos polimorfonucleares são também denominados granulócitos polimorfonucleares ou apenas granulócitos ²⁰.

Os leucócitos têm como função a defesa do organismo, como proteger contra microrganismos invasores e outras células anormais e eliminar detritos celulares. A contagem de leucócitos total normal está entre 3,7 e 9,5 x 10³/μL nos homens e 3,9 a 11,1 x 10³/μL nas mulheres. A elevação da contagem de leucócitos serve como marcador de ativação imunológica e inflamação e é observada em infeções, lesões, doenças hematológicas e alergias. Nas últimas décadas, as contagens elevadas de leucócitos no sangue periférico foram consistentemente associadas a um risco aumentado de doença

cardiovascular, diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólico, doença hepática gordurosa não alcoólica, entre outros.⁸⁷.

8.2.2.2 Neutrófilos

O neutrófilo (Figura 20) maduro mede 12-15 μm de diâmetro. O citoplasma é acidófilo, com muitos grânulos delicados. São menores que os monócitos e eosinófilos e discretamente maiores que os basófilos. O núcleo é corado intensamente, irregular e, por vezes, assume formas comparáveis às letras E, Z e S. Um neutrófilo segmentado possui pelo menos dois de seus lobos separados por um filamento. Um neutrófilo bastonete pode apresentar tanto uma fita de material nuclear, mais espessa que o filamento que conecta os lobos, quanto um núcleo em forma de U com espessura uniforme. Os neutrófilos segmentados correspondem, em média, a 56% dos leucócitos, com intervalos de referência entre 1,7 e 6,1 $\times 10^3/\mu\text{L}$ nos homens e 1,7 a 7,5 $\times 10^3/\mu\text{L}$ nas mulheres ^{1,20}.

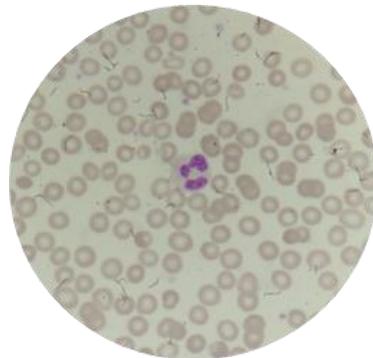


Figura 20: Exemplo de um neutrófilo observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.

8.2.2.3 Linfócitos

Os linfócitos (Figura 21) são células mononucleares desprovidas de grânulos citoplasmáticos específicos. O diâmetro dos linfócitos do sangue periférico varia de 10 a 16 μm . Os linfócitos pequenos (10-12 μm), que predominam, têm citoplasma escasso e núcleo redondo, ligeiramente indentado, com cromatina condensada. Os linfócitos grandes (12-16 μm), que constituem cerca de 10% dos linfócitos circulantes, têm citoplasma mais abundante e cromatina nuclear menos condensada. O citoplasma, por ser levemente basófilo e cora-se em azul-pálido. Os linfócitos representam, em média, 34% de todos os leucócitos, apresentando uma variação de 1,0 a 3,2 $\times 10^3/\mu\text{L}$. Os linfócitos e seus derivados - os plasmócitos - fazem parte da defesa imunitária do corpo humano ^{1,20}, tal como todas as células da linhagem branca.

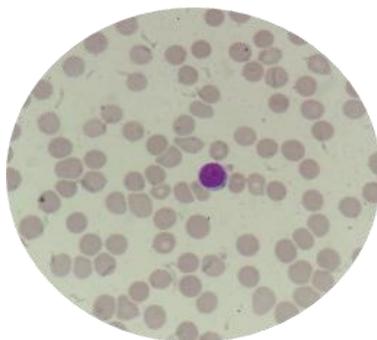


Figura 21: Exemplo de um linfócito observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.

8.2.2.4 Monócitos

O monócito (Figura 22) é a maior célula presente no sangue periférico normal, com um diâmetro de 12-20 μm . Apresenta um núcleo irregular, geralmente lobulado. O citoplasma é abundante e azul-acinzentado, com aspecto de vidro fosco, e muitas vezes contém grânulos finos de cor vermelha a púrpura que são menos distintos e menores que os grânulos dos neutrófilos. Nalguns casos podem ser observados grânulos azuis. O contorno celular é irregular, e o citoplasma pode ser vacuolizado. Monócitos produzidos sob condições de estímulo da medula óssea, como infecção ou recuperação de uma supressão da hematopoiese, mostram aumento da relação núcleo-citoplasma, padrão mais delicado da cromatina, nucléolos e aumento do número de vacúolos. Os monócitos correspondem, em média, a 4% dos leucócitos, e o intervalo de referência para adultos é de aproximadamente 0,2 a 0,6 $\times 10^3/\mu\text{L}$ ^{1,20}.

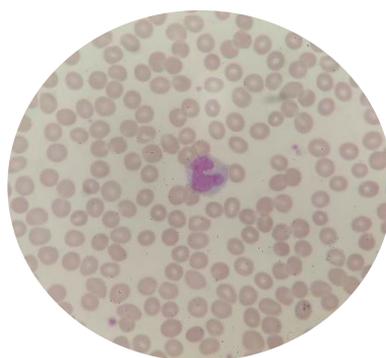


Figura 22: Exemplo de um monócito observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.

8.2.2.5 Eosinófilos

O eosinófilo (Figura 23) é um pouco maior do que o neutrófilo, com um diâmetro de 12-17 μm , normalmente com núcleo bilobulado, mas pode ser trilobulado. A estrutura destas células assemelha-se à dos neutrófilos polimorfonucleares, com a diferença que, em vez de

grânulos neutrofílicos, o citoplasma contém grânulos maiores, arredondados ou ovais, que apresentam forte afinidade para corantes ácidos. São reconhecidos com facilidade através do seu tamanho e da cor dos grânulos, que se coram de vermelho brilhante pela eosina. O citoplasma é incolor. Os eosinófilos, em média, correspondem a 3% da população de leucócitos de um indivíduo adulto, com um valor de referência de $0,03$ a $0,46 \times 10^3/\mu\text{L}$ ^{1,20}. Os eosinófilos desempenham um papel homeostático nas respostas imunes do corpo. Estas células estão envolvidas no combate a algumas infecções parasitárias, bacterianas e virais e certos tipos de cancro. Têm funções patológicas em doenças como asma, rinossinusite crónica com pólipos nasais, distúrbios gastrointestinais eosinofílicos e síndromes hipereosinofílicas ⁸⁸.

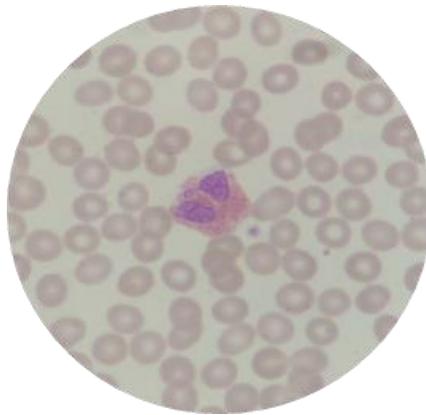


Figura 23: Exemplo de um eosinófilo observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.

8.2.2.6 Basófilos

Em geral, os basófilos (Figura 24) assemelham-se aos neutrófilos, exceto pelo núcleo menos segmentado e pelos grânulos maiores com forte afinidade por corantes básicos. O basófilo tem tamanho semelhante ao do neutrófilo ($10-14 \mu\text{m}$ de diâmetro). O núcleo é geralmente escuro devido aos grânulos preto-arroxeados. Os basófilos apresentam grânulos anormais em várias condições hereditárias. Os grânulos podem estar em número reduzido em neoplasias mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas, em condições alérgicas agudas (como urticaria e choque anafilático) e durante a hiperlipemia pós-prandial, pode ocorrer desgranulação. Os basófilos são os leucócitos menos numerosos no sangue periférico normal, representando em média 0,5% do total, sendo os valores de referência de $0,02$ a $0,09 \times 10^3/\mu\text{L}$ ^{1,20}.

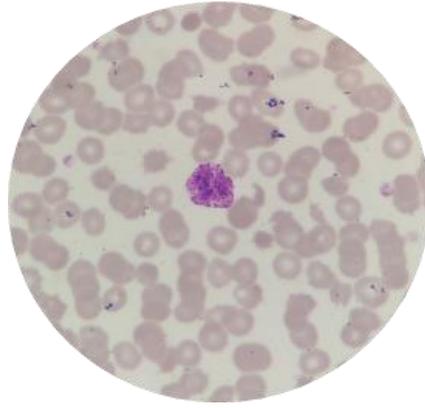


Figura 24: Exemplo de um basófilo observado ao microscópio. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.

8.2.3 Plaquetograma

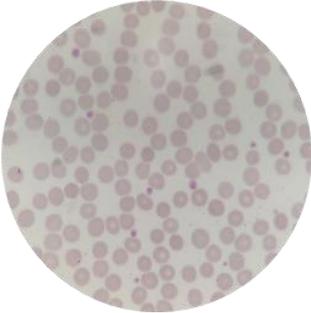
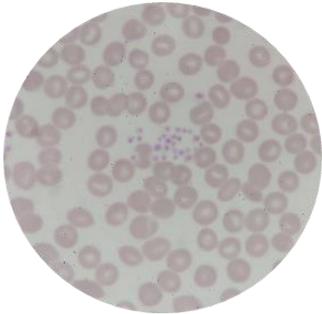
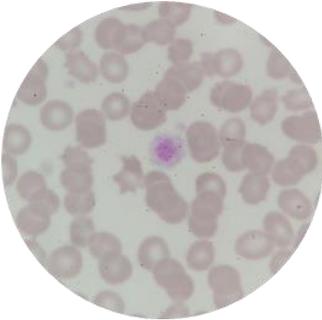
O plaquetograma é a parte do hemograma que se destina ao estudo das plaquetas presentes no sangue periférico. Envolve a contagem de plaquetas e a avaliação da sua morfologia para a determinação do Volume Plaquetar Médio (MPV) e da Variação entre Volumes (PDW).

8.2.3.1 Plaquetas

As plaquetas são discos finos com diâmetro de 1,5 a 3 μm . Contêm grânulos finos azurófilos, dispersos no citoplasma ou concentrados no centro. Em sangue colhido para o tubo que contém K_3EDTA , as plaquetas geralmente permanecem separadas umas das outras; em sangue nativo, mostram uma tendência a agregar-se. Têm função de atuar na homeostasia, na manutenção da integridade vascular e no processo de coagulação sanguínea. O valor considerado normal para a contagem das plaquetas é entre 150 000 e 450 000 plaquetas/ μL de sangue ^{1,20}.

As plaquetas desempenham um papel importante nos vasos sanguíneos. Após a sua formação a partir dos megacariócitos, as plaquetas permanecem em circulação por 5 a 7 dias e funcionam principalmente como reguladores da hemostasia e trombose ⁸⁹. As plaquetas também desempenham papéis secundários como auxílio na regulação da angiogênese e imunidade inata ⁹⁰.

Tabela 14: Tabela com exemplos de plaquetas observadas ao microscópio. Imagens obtidas do CHTV.

Nome	Imagem
Plaquetas	
Agregados Plaquetares	
Plaqueta Gigante	

8.2.3.2 MPV

MPV corresponde ao volume plaquetar médio em circulação e é expresso em fentolitros. Os valores de MPV para indivíduos normais, segundo o aparelho do CHTV, vão de 6,36 a 11,36 fL²⁰.

8.2.3.3 PDW

PDW dá informação acerca da amplitude de distribuição (volumétrica) das plaquetas, indicando a presença de anisocitose plaquetar e é expresso em fentolitros ou percentagem. Os valores considerados normais, segundo o aparelho do CHTV, são de 7,9 a 11,3 fL²⁰.

8.2.4 Execução e observação de esfregaços de sangue periférico

De modo a visualizar as células ao microscópio, é necessário fazer um esfregaço de sangue periférico e corar a lâmina adequadamente. Estas lâminas são preparadas e examinadas apenas em alguns casos específicos. Há diretrizes para a escolha, frente aos dados numéricos e alertas dos resultados do contador automático, havendo a necessidade de complementar o resultado do hemograma com microscopia²⁰. A Figura 25 mostra o procedimento correto para obter um bom esfregaço de sangue periférico, como tive oportunidade de efetuar no laboratório de hematologia.

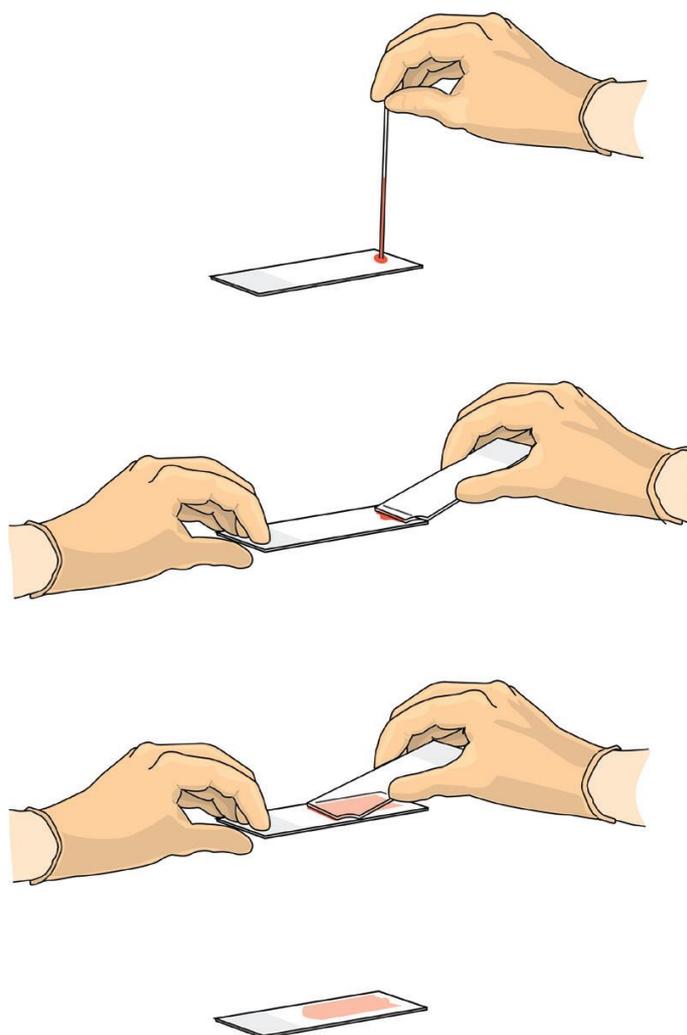


Figura 25: Procedimento na preparação de um esfregaço de sangue periférico ⁷⁸.

Relativamente à coloração, o CHTV realiza a coloração de Wright para permitir a visualização das células sanguíneas ao microscópio. A coloração de Wright é um dos métodos de coloração mais utilizados, tendo como objetivo corar esfregaços de sangue

periférico. Através deste método de coloração, diferentes tipos de células sanguíneas podem ser diferenciados adequadamente ⁹¹.

A coloração de Wright é um procedimento de natureza policromática composta por azul de metileno e mistura de eosina. Utiliza metanol, para garantir a fixação das células à lâmina antes da coloração ⁹¹.

Existem dois tipos de corantes usados na coloração de Wright: um é corante aniônico na forma de Eosina Y e o outro é um corante catiónico na forma de azul de metileno. O tampão é utilizado para diluir a solução, o que desencadeia o processo de ionização ⁹¹.

A eosina tem função de corar componentes primários como grânulos de hemoglobina e eosinofílicos, mudando a cor de laranja para rosa. Os componentes celulares classificados como ácidos são corados pelo azul de metileno, como ácidos nucleicos e grânulos basofílicos ⁹¹.

Após o esfregão estar completamente seco, aplica-se 1mL do corante de Wright durante 2 min, passa-se suavemente por água e depois aplicam-se 2mL de tampão fosfato pH 7,2 durante 4 min. Em seguida enxagua-se e deixa-se secar para visualizar ao microscópio.

Existe ainda outra coloração específica para as lâminas de medula óssea. Quando estas chegam ao laboratório, primeiramente confirma-se o seu estado e só depois se procede às respectivas colorações. São efetuadas tanto a coloração de Wright, como a coloração de Perls. A coloração de Perls baseia-se na reação entre o ferrocianeto ácido e o íon férrico (Fe^{3+}) da hemossiderina, com conseqüente formação de ferrocianeto férrico, que cora azul intenso (azul-da-Prússia). Este tipo de coloração tem como principal objetivo permitir a visualização microscópica de ferro em amostras de medula óssea ²⁰.

8.3 Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VS) é considerado um teste inespecífico, no entanto é um importante marcador indireto da resposta inflamatória aguda, aparecendo aumentada na presença de infecções e processos inflamatórios crônicos e agudos. Quando sangue venoso bem homogeneizado é colocado num tubo posicionado na vertical, os eritrócitos tendem a sedimentar. Portanto, a VS, mede a taxa na qual os eritrócitos sedimentam durante um período de tempo específico em mm/hora ^{1,92}.

No CHTV o aparelho automático para a medição da VS é o ALIFAX Test 1 BCL (Beckman Coulter) (Figura 26). Existem vários métodos diferentes para determinar a VS, o método Westergren convencional é ainda considerado o de referência. Este método mede a sedimentação de eritrócitos após uma hora num tubo vertical, analisando assim as 3 fases do processo: agregação, sedimentação e empacotamento. Por razões práticas, o método de Westergren é pouco utilizado na determinação de rotina da VS, pois apresenta risco de

infecção (tubos abertos), necessita de volumes de sangue relativamente grandes e, tem um tempo de análise demorado (uma hora) ⁹³. No CHTV o aparelho automático para a medição da VS é o ALIFAX Test 1 BCL que utiliza um método de medição de VS alternativo por tecnologia fotométrica cinética capilar. O sangue é centrifugado e depois de perfurar a tampa de borracha do tubo com uma agulha fixa são efetuadas leituras de densidade ótica durante 20 segundos, diretamente relacionadas com o grau de agregação de eritrócitos, sendo lido por um fotómetro. Os resultados são transformados num valor do método Westergren (método clássico), expresso em milímetros por hora (mm/h) ⁹⁴.

Os valores de referência para este parâmetro laboratorial são para homens saudáveis 0-15 mm/h e para mulheres saudáveis <20 mm/h.



Figura 26: ALIFAX Test 1 BCL. Imagem obtida do laboratório de hematologia do CHTV.

8.4 Hemóstase

A hemóstase é definida como um processo fisiológico que estabelece o equilíbrio entre o risco de hemorragia e o risco de trombose. Trata-se de um equilíbrio dinâmico entre ativadores e inibidores. Sendo assim, após lesão de um vaso sanguíneo, a hemóstase tem a principal função de controlar a hemorragia, induzindo a formação de um coágulo, de forma vigiada e rápida. A hemostasia ocorre no compartimento vascular revestido pelo endotélio.

A hemostasia normal e a trombose envolvem inúmeros fatores, que incluem plaquetas, granulócitos e monócitos, bem como fatores de coagulação (formação do coágulo), fatores do sistema fibrinolítico (lise do coágulo) e de proteínas anticoagulantes (reguladores). Portanto, podem destacar-se 3 fases da hemóstase: hemóstase primária (formação do trombo plaquetar), coagulação (ocorre em cascata com a presença de vários fatores) e fibrinólise (dissolução do coágulo). É regulada tanto por fatores intravasculares como extravasculares. Estes últimos envolvem os tecidos localizados na periferia dos vasos e também os que estão na estrutura vascular lesada, local onde ocorre um processo de vasoconstricção reflexa e formação de um coágulo primário. Já os intravasculares consistem em fatores plaquetares, proteínas plasmáticas, fosfolípidos e íões cálcio que estão envolvidos na coagulação sanguínea ^{1,78}.

8.5 Coagulação

O sistema de coagulação é essencial para a manutenção de um sistema circulatório fechado de alta pressão. A ativação apropriada da coagulação em resposta à lesão vascular é necessária para uma hemostasia efetiva. A coagulação é frequentemente dividida em 3 etapas:

- 1) hemostasia primária que é iniciada pelo acúmulo e ativação de plaquetas no local da lesão vascular;
- 2) hemostasia secundária que termina com a formação de uma rede de fibrina;
- 3) hemostasia terciária que começa com a reticulação da fibrina e termina com a dissolução do trombo (que inclui fibrinólise) ⁹⁵.

Os testes clínicos de coagulação são ensaios funcionais que avaliam a taxa de formação de coágulos a partir do momento em que a cascata de coagulação é ativada. Estes testes são usados para identificar defeitos das vias comuns, extrínseca e intrínseca da cascata de coagulação. As medições do tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) são frequentemente usadas para detetar anomalias da hemostasia secundária. A medição de fibrinogénio é normalmente utilizada para detetar deficiências de fibrinogénio e defeitos da sua atividade ⁹⁶.

Em caso de hemorragia, primeiramente ocorre vasoconstricção dos vasos sanguíneos, seguidamente adesão às fibras do colagénio pelo fator von Willebrand e depois agregação plaquetar formando o rolhão plaquetar de modo a minimizar a hemorragia inicial ²⁰.

Após estes processos segue-se a hemóstase secundária que é dependente dos fatores da coagulação. A cascata de coagulação é assim denominada devido a ocorrência de ações em cadeia. O modelo clássico de coagulação, refletido pela cascata de coagulação (Figura 27), foi proposto cientificamente pela primeira vez em 1960. É constituída por duas vias: via extrínseca e via intrínseca que convergem, formando a via comum a partir da ativação do

fator X. A via extrínseca é refletida pela ativação do fator tecidual do fator VII (PT) exposto pela lesão vascular com o fator VIIa plasmático, que, por sua vez, ativa IX e X, o que resulta na formação de pequenas quantidades de trombina. Já a via intrínseca é refletida pela ativação da via de contato (aPTT). Essas vias convergem para uma via comum, ligando-se pela produção de trombina pelo complexo protrombinase e pela conversão do fibrinogênio em fibrina pela trombina. Estas reações ocorrem nas superfícies dos fosfolipídios que aparecem na superfície das plaquetas ativadas ^{97,98}.

Por fim, ocorre a última etapa denominada fibrinólise. O sistema fibrinolítico endógeno é ativado para eliminar a fibrina formada anteriormente, de modo a manter a permeabilidade da circulação. O plasminogênio dá origem à plasmina que irá dissolver a fibrina. A plasmina é a principal protease ativada para digerir os produtos de degradação. A regulação fisiológica da fibrinólise ocorre principalmente por meio de inibidores do ativador do plasminogênio e da antiplasmina que inibem a plasmina ⁹⁷.

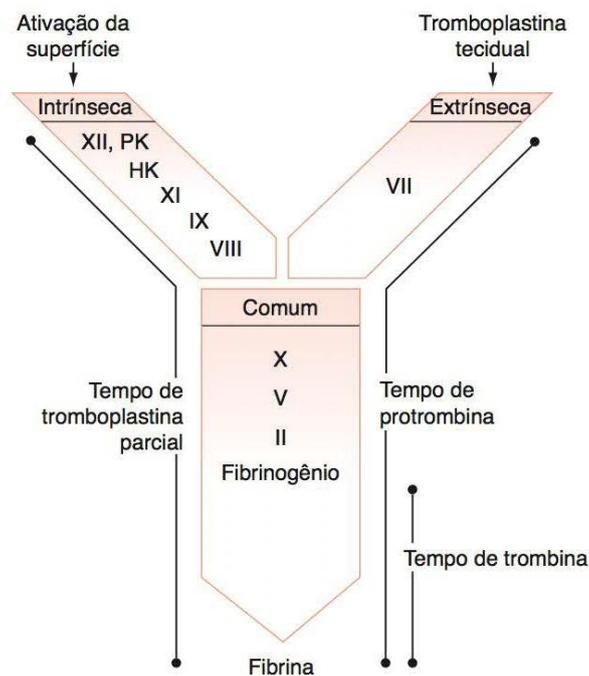


Figura 27: Figura representativa da cascata de coagulação sanguínea ⁷⁸.

8.5.1 Estudo da Hemóstase

ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory, Werfen) (Figura 28) é um equipamento para análise da hemóstase utilizado no laboratório de hematologia do CHTV. Pode realizar medições coagulométricas (turbidimétricas), cromogêneas (absorvância) e imunológicas^{99,100}:

- O princípio da detecção coagulométrica (turbidimétrica) é usado no sistema para medir e registrar o tempo necessário para uma amostra de plasma coagular. Esta técnica avalia o ponto final de coagulação medindo a mudança na densidade ótica.
- Os canais cromogêneos utilizam o princípio colorimétrico de medição de absorvância na cuvete. Um sensor ótico lê a luz (405 nm) que passa pela cuvete. A luz é absorvida pelo fluido e diretamente proporcional à concentração de paranitroanilina. A quantidade de luz que chega ao fotodetector é convertida num sinal elétrico que é proporcional à atividade da enzima.
- O princípio da medição imunológica é usado no sistema para medir e registrar diretamente a quantidade de um analito. Esta técnica avalia a concentração física do analito (e não a sua atividade) medindo a mudança na densidade ótica. Embora semelhante ao método turbidimétrico, o método imunológico baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo para efetuar a transmissão da luz.



Figura 28: Aparelho ACL TOP 700 (IL) utilizado no laboratório de hematologia do CHTV.

8.5.2 Estudos de coagulação

Os estudos da coagulação são efetuados em plasma colhido a partir de um tubo de citrato de sódio centrifugado.

Vários testes de triagem são usados no laboratório clínico para um doente com um problema hemorrágico, com o intuito de classificar e diagnosticar a base do distúrbio. As proteínas da coagulação são classificadas como membros do sistema intrínseco, do sistema extrínseco ou da via comum. Esta abordagem permite um diagnóstico diferencial prático no sentido de

definir qual(is) proteína(s) pode(m) ser afetada(s) com base nos resultados de uma série de testes de triagem, portanto os fatores podem ser doseados individualmente ^{1,20}.

No CHTV, o estudo da coagulação divide-se em coagulação normal e coagulação especial. Na coagulação normal são avaliados parâmetros como TP, aPTT, d-dímeros e fibrinogénio. Na coagulação especial podem ser avaliados parâmetros para estudo da trombofilia (AT, proteína C e proteína S), do anticoagulante lúpico, do fator de Von Willebrand ou doseamento de qualquer fator específico da cascata de coagulação, caso seja pedido pelo médico.

Na Tabela 15 estão presentes os fatores que participam na cascata de coagulação ⁷⁸.

Tabela 15: Número e respetivo nome dos fatores presentes na cascata de coagulação.

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

8.5.3 Tempo de Protrombina

O TP está relacionado com a via extrínseca e avalia os fatores VII, X, V, II e fibrinogénio. Também é um parâmetro útil na monitorização de doentes com terapêutica anticoagulante oral. O valor de referência para uma coagulação normal varia de 10 a 14 segundos. É normalmente expresso em INR (*International Normalized Ratio*) e deve variar entre 2 e 3, no caso de pessoas sob tratamento com anticoagulantes orais ²⁰.

O teste mede o tempo (em segundos) necessário para a formação do coágulo após o reagente de tromboplastina (uma mistura de fatores tecidulares (TFs), lípidos e cloreto de cálcio) ser adicionado ao plasma pobre em plaquetas (PPP). Se o PT for corrigido após a adição de plasma normal, está implícita a deficiência congénita ou adquirida do(s) fator(es) de

coagulação, enquanto, se o PT permanecer prolongado após a adição de plasma normal, aumenta a possibilidade de existência de inibidores. Defeitos adquiridos de fatores de coagulação que prolongam o PT são comumente observados em pessoas com deficiência de vitamina K ⁹⁸.

8.5.4 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

O aPTT está relacionado com a avaliação das alterações da via intrínseca e/ou comum da coagulação avaliando os fatores VIII, IX, XI e XII, além dos fatores X, V e fibrinogénio. Também é útil na monitorização de doentes com terapêutica através de anticoagulante endovenoso (heparina) e para monitorização de hemofilia. O tempo normal para coagulação é de 30 a 40 segundos ^{20,101}.

Para realizar este teste, incubam-se fosfolípidos no plasma do doente com citrato de sódio por vários minutos. Acrescenta-se então cloreto de cálcio e mede-se o tempo necessário para a formação de um coágulo. Os fosfolípidos e os íões de cálcio funcionam como ativadores de contacto dando origem ao início da cascata de coagulação que culmina na formação do coágulo de fibrina. O tempo que o plasma demorar a formar o coágulo corresponde ao tempo de tromboplastina parcial ativada ¹.

8.5.5 Fibrinogénio

O fibrinogénio, ou fator I, é uma glicoproteína sintetizada no fígado. É um substrato para a trombina e é considerado a principal molécula de adesão que atua na agregação plaquetária. Os níveis de fibrinogénio afetam a velocidade de formação do coágulo. Também é considerado uma proteína de fase aguda encontrando-se elevada em processos inflamatórios. Os valores de referência para o doseamento do fibrinogénio vão de 200 a 400 mg/dL ¹.

A quantificação do fibrinogénio é feita através do método de Clauss. Neste procedimento adiciona-se excesso de trombina ao plasma diluído e mede-se o tempo de coagulação resultante. O tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio plasmático ¹⁰².

8.5.6 D-Dímeros

D-dímeros são um dos vários fragmentos que são produzidos quando a plasmina, a enzima ativada através da via fibrinolítica, cliva a fibrina para degradar os coágulos. Este fragmento forma epítomos únicos que podem ser direcionados por anticorpos monoclonais em ensaios de D-dímero para confirmar que a cascata de coagulação está a formar trombina ¹⁰³. Portanto, D-dímeros são biomarcadores de formação e degradação de fibrina que podem ser medidos no sangue total ou no plasma. Indivíduos saudáveis têm baixos níveis de D-dímeros circulantes. A quantificação de D-dímeros tem sido usada para prever quais são os doentes mais propensos a desenvolver tromboembolismo venoso ¹⁰⁴.

O aparelho ACL TOP 700 usa ensaios de aglutinação de látex contemporâneos através de técnicas imunoturbidométricas para detetar D-dímeros, conjugado com esferas de látex revestidas com anticorpos monoclonais. Isto é, quando o plasma que contém D-dímeros se mistura com o reagente látex e o tampão de reação, as partículas aglutinam. O grau de aglutinação é proporcional à concentração de D-dímeros no plasma ¹⁰⁵.

8.5.7 Estudo da Trombofilia

8.5.7.1 Antitrombina

A antitrombina (AT, também chamada AT III) é uma glicoproteína produzida no fígado. É um inibidor da serina protease da superfamília das serpinas que regula a atividade proteolítica das proteases pró-coagulantes das vias intrínseca e extrínseca. A função da antitrombina é inibir todas as proteases pró-coagulantes da cascata de coagulação do sangue, os seus alvos primários parecem ser a trombina e os fatores Xa e IXa. A deficiência adquirida ou congénita de AT está associada ao aumento do risco de trombose venosa e embolia pulmonar ^{1,106}.

De modo a quantificar o principal inibidor fisiológico da coagulação, incuba-se o plasma com o reagente Fator Xa, na presença de excesso de heparina e quantifica-se a atividade do Fator Xa residual com um substrato cromogéneo sintético, que liberta paranitroanilina. Esta última é monitorizada cineticamente a 405 nm sendo o seu nível inversamente proporcional à AT presente na amostra ¹⁰⁷.

8.5.7.2 Proteína C

A proteína C (PC) é uma pró-enzima serina protease dependente de vitamina K que é convertida em proteína C ativada (APC) pelo complexo trombina e trombomodulina. Após a ativação, a APC forma um complexo com a proteína S na superfície do fosfolípido para inativar rapidamente os fatores Va e VIIIa, evitando gerar trombina, aumentando assim a atividade fibrinolítica no plasma. A sua quantificação deteta a hipercoagulação associada a trombose venosa. O seu défice pode ser adquirido, estando associado a hepatopatias, terapêutica com anticoagulantes orais e em situações de coagulação intravascular disseminada ¹⁰⁸.

A avaliação da Proteína C é feita por incubação do plasma com um ativador de PC (veneno de serpente), com conversão em APC que é depois quantificada utilizando um substrato cromogéneo sintético, similar ao da AT ¹⁰⁹.

8.5.7.3 Proteína S

Ao contrário de outras proteínas plasmáticas dependentes de vitamina K, a proteína S (PS) não é uma serina protease, mas funciona como um cofator no sistema da proteína C ativada, aumentando os seus efeitos. O complexo APC e PS na superfície fosfolipídica das plaquetas

ou de outras células, rapidamente inativa os fatores Va e VIIIa, diminuindo de forma significativa a formação de trombina nas vias pró-coagulantes ¹⁰⁸. Portanto, a proteína S é uma molécula que atua como cofator não enzimático, ligando-se em equilíbrio a uma grande proteína do complemento - a *binding protein* C4b (60%). Somente a forma livre da PS possui atividade de cofator, correspondente a 40% ¹.

A deficiência de PS pode ser congênita ou adquirida. Esta última pode ser observada durante a gravidez, na terapia com anticoagulante oral, com o uso de anticoncepcionais orais, nas hepatopatias, recém-nascidos e outras condições clínicas. A deficiência de proteína S está associada a um risco aumentado de tromboembolismo venoso ¹⁰⁸.

A presença de PS livre é determinada pela avaliação do aumento da turbidimetria resultante da aglutinação de dois reagentes de látex com o plasma do doente, na presença de íons Ca^{2+} , sendo o grau de aglutinação diretamente proporcional à concentração de PS livre presente no plasma ¹¹⁰.

8.5.8 Anticoagulante Lúpico

Os anticorpos antifosfolípidos (aPL) são fatores de risco adquiridos para trombose e desfechos adversos na gravidez. Quando os doentes apresentam trombose ou morbidade relacionada com a gravidez e aPL persistentes, são diagnosticados com síndrome antifosfolipídica (APS) de origem autoimune. O termo "aPL" refere-se a um grupo heterogêneo de autoanticorpos direcionados contra uma ampla variedade de proteínas com afinidade por fosfolípidos carregados negativamente, incluindo vários fatores de coagulação e outras proteínas plasmáticas como PT, PS, trombomodulina, entre outras. O termo anticoagulante lúpico (AL) é aplicável a esses anticorpos que afetam as reações das proteínas da coagulação. O AL interfere de forma variável no aPTT e no PT ^{1,111}.

O AL deve prolongar o tempo de coagulação de um teste fosfolipídico dependente, portanto não deve haver correção do prolongamento do tempo ao adicionar plasma normal. Para a detecção de AL são utilizados dois métodos: o veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT) e o Teste *Silica Clotting Time* (SCT). São realizados testes de rastreio (*Screening*) e confirmatórios (*Confirm*) para cada um. O teste de *Screen* SCT possui uma baixa concentração de fosfolípidos, o que faz com que o reagente seja altamente sensível à presença do AL, prolongando o tempo de coagulação. Já o *Confirm* SCT, consiste numa alta concentração de fosfolípidos neutralizando o AL e conseqüentemente encurta o tempo de coagulação ¹¹². No teste dRVVT, o veneno de víbora de Russell é encarregado de ativar o fator X da cascata da coagulação que leva à formação do coágulo de fibrina na presença do fator V, fosfolípidos e íons cálcio. O AL ao ligar aos fosfolípidos impede a ação do veneno de víbora de Russell e, conseqüentemente, prolonga o tempo de coagulação. Se um dos testes for positivo, a amostra é considerada positiva no estudo de AL ¹¹³.

8.5.9 Fator de Von Willebrand

O fator de von Willebrand (vWF) é uma glicoproteína alto peso molecular, adesiva e multimérica. Está presente no plasma, plaquetas, células endoteliais e no subendotélio. Durante a hemostasia primária, o vWF medeia a adesão plaquetária a componentes da matriz extracelular, como o colagênio. No plasma, o vWF serve como transportador e proteína estabilizadora para o fator VIII pró-coagulante. Doentes com deficiência quantitativa ou qualitativa das concentrações de vWF, frequentemente associadas também a concentrações diminuídas de fator VIII, são afetados pela doença de von Willebrand (DvW), um distúrbio hemorrágico ¹¹⁴.

Para a determinação quantitativa do antígeno do vWF em plasma com citrato de sódio, mistura-se com o reagente de látex e o tampão de reação. Se o plasma for positivo para o antígeno, as partículas de látex revestidas aglutinam. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de vWF:Ag na amostra e é determinado medindo a diminuição da luz transmitida causada pelos agregados ¹¹⁵.

8.6 Citometria de Fluxo

Neste setor também é efetuada a técnica de citometria de fluxo (CF) através do equipamento Cytimics FC 500 (Beckman Coulter). Este equipamento permite a utilização de vários fluoróforos, no entanto no laboratório de hematologia do CHTV apenas se usa para a monitorização de doentes com VIH.

A CF é utilizada para contar e classificar células, assim como partículas virais, fragmentos de DNA, bactérias, entre outros ¹. Utilizam-se anticorpos marcados diretamente com fluorocromos, que permitem analisar imunofenotipicamente a expressão de dois, três ou quatro antígenos, junto com uma avaliação da intensidade de expressão de cada um deles ²⁰.

A CF é uma ferramenta essencial para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico de várias neoplasias hematológicas, assim como para imunodeficiências primárias ou adquiridas. O aumento do número de indivíduos portadores de VIH proporcionou um progresso considerável da CF. A procura por serviços equipados com tecnologia de quantificação de linfócitos T CD4⁺ é cada vez mais frequente, e o uso de ferramentas que melhoram a rapidez, eficiência e qualidade do diagnóstico e monitorização da imunodeficiência tornou-se a base da prática clínica ¹¹⁶.

Na CF é utilizado um sistema para identificação e enumeração simultânea de percentagens e contagens absolutas de subpopulações linfocitárias. O sistema Cytimics FC 500 incorporado com *software* CXP (análise dos dados), é um sistema utilizado para identificação e enumeração simultânea de percentagens e contagens absolutas de subpopulações linfocitárias. Este sistema combina reagentes de anticorpos monoclonais

fluorescentes (CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 e CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5), reagentes de controlo de qualidade, reagente de contagem absoluta e um *software* incorporado para a análise automática das populações de linfócitos em sangue total. Os linfócitos B, T e *natural killer* (NK) são diferenciados através de características antigénicas presentes nas suas membranas celulares. Este teste baseia-se na capacidade de um anticorpo monoclonal se ligar à superfície das células que expressam determinados antígenos. A coloração celular específica é feita pela incubação do sangue total com o reagente de anticorpo monoclonal anteriormente referido, uma combinação de 4 anticorpos monoclonais de roedor e cada um deles é conjugado com um fluorocromo específico para cada antígeno de superfície celular diferente. Os eritrócitos são previamente submetidos a uma lise e os leucócitos excedentes são analisados no sistema de CF. A percentagem de linfócitos é calculada segundo uma fórmula fornecida pela bula do aparelho ¹¹⁷, expressa da seguinte maneira:

$$\begin{aligned} & \% \text{ linfócitos totais} \\ & = \% \text{ linfócitos T CD3(+)} + \% \text{ linfócitos B CD19(+)} \\ & + \% \text{ linfócitos NK } \frac{\text{CD3(-)}}{\text{CD56(+)}} \end{aligned}$$

9. Laboratório de Bioquímica

A química clínica é uma ciência que analisa e quantifica substâncias biologicamente importantes (chamadas analitos) em fluidos corporais. Os métodos para medir essas substâncias são cuidadosamente projetados para fornecer avaliações precisas da sua concentração. Os exames efetuados no setor de bioquímica são relacionados com a investigação do funcionamento dos processos metabólicos do organismo¹¹⁸. Os parâmetros analisados estão presentes na Tabela 16:

Tabela 16: Parâmetros avaliados no laboratório de química analítica do CHTV.

Grupo	Parâmetros
Avaliação da fertilidade	Estrogênio, FSH, LH, Progesterona, Testosterona.
Avaliação de anemias	Folatos, Metabolismo do ferro, Vitamina B12.
Avaliação de diabetes	Glicose, Insulina.
Avaliação de doenças autoimunes	Fator reumatoide.
Doseamento de proteínas	Albumina, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ .
Drogas de abuso	Anfetaminas, Cocaína, Canabinóides, Fenciclidina, Metadona, Metanfetaminas, Metilenodioximetanfetamina, Opiáceos.
Drogas terapêuticas	Antidepressivos tricíclicos, Barbitúricos, Benzodiazepinas, Oxicodona.
Ionograma	Cloro, Potássio, Sódio.
Marcador de inflamação	Proteína C Reativa.
Marcadores cardíacos	CK-MB, Homocisteína, LDH, Mioglobina, Pró-BNP, Troponina.
Marcadores tumorais	Antígeno HEA, CA 15.3, CA 19.9, CA 125, CEA, PSA (livre e total).
Parâmetros do metabolismo do ferro	Ferritina, Ferro, TIBC, Transferrina.
Perfil Endócrino	Cortisol, FSH, Insulina, LH, Peptídeo C, Prolactina, PTH, T ₃ , T ₄ , TSH, Vitamina D, β -HCG.
Perfil Hepático	ALT, AST, Bilirrubinas (total, direta, indireta), Fosfatase Alcalina, LDH, γ -GT.
Perfil Lipídico	Colesterol HDL, Colesterol LDL, Colesterol total, Triglicéridos.
Perfil ósseo	Cálcio, Fósforo inorgânico, Magnésio.
Perfil Pancreático	Amilase, Lipase.
Perfil Renal	Ácido úrico, Albumina, Creatinina, Microalbumina, Ureia.
Serologias	CMV (IgG e IgM), EBV (IgG e IgM), Hepatite A, B, C (antígenos e anticorpos), HIV, Rubéola (IgG e IgM), Sífilis, Toxoplasmose (IgG e IgM)

As amostras usadas neste setor, são previamente centrifugadas, tanto urina como sangue, deste último obtém-se o soro que vai permitir efetuar as quantificações desejadas. De modo a facilitar a rotina de trabalho, todas as amostras, após centrifugação, são colocadas num sistema automatizado da Siemens Diagnostics, Automação Aptio, que gere a passagem das amostras pelos vários equipamentos necessários à realização dos parâmetros requisitados pelo médico. Os equipamentos utilizados são: Advia 1800 (Siemens Diagnostics), Advia Centaur XPT (Siemens Diagnostics) e Alinity (Abbot Diagnostics).

No caso de pedidos provenientes do Serviço de Urgência ou internamento urgente existem equipamentos dedicados de modo a garantir a rapidez dos resultados. DxH 600 (Beckman Coulter) para realização de hemogramas, ACL Top 500 (IL - Werfen) para parâmetros de coagulação, Advia® Centaur XP (Siemens Diagnostics) e Advia® Chemistry XPT (Siemens Diagnostics) para parâmetros bioquímicos e serológicos considerados urgentes e por fim Gem®5000 (IL – Werfen) para análise de gasometrias arteriais e venosas.

No Serviço de Patologia Clínica do CHTV existe, ainda, uma subsecção do sector de química clínica denominada Bioquímica Especial onde são analisados parâmetros que implicam maior dedicação por parte dos Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) e Especialistas, como eletroforeses séricas e urinárias, imunofixações séricas e urinárias, eletroforeses de hemoglobinas, quantificação de hemoglobina glicosilada, marcadores tumorais mais específicos, parâmetros de diagnóstico pré-natal, serologias, etc.

10. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular

10.1 Imunologia

A imunologia é o estudo das moléculas, células, órgãos e sistemas responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de substâncias estranhas (não próprias), como componentes do corpo que respondem e interagem entre si, estudo das consequências desejáveis e indesejáveis das interações imunológicas e as formas como podem manipular o sistema imunológico, de forma benéfica, para proteger ou tratar doenças. As células do sistema imunológico consistem em linfócitos (elementos celulares específicos), células especializadas que capturam e exibem antígenos microbianos e células efetoras que eliminam microrganismos. O sistema imunológico também possui mecanismos efetores inespecíficos que geralmente amplificam as funções específicas. Componentes não específicos do sistema imunológico incluem fagócitos mononucleares, leucócitos polimorfonucleares e fatores solúveis (por exemplo, complemento) ¹¹⁹.

O setor da imunologia no CHTV inclui análises de serologia, autoimunidade e alergologia, sendo equipado por analisadores automatizados descritos na Tabela 17.

10.2 Biologia Molecular

A biologia molecular refere-se à análise de ácidos nucleicos com o objetivo diagnosticar doenças, prever a sua ocorrência, determinar o prognóstico de uma doença diagnosticada e orientar a terapia, por meio do uso de métodos de amplificação baseados em PCR e nos modernos métodos de hibridização de DNA altamente sensíveis.

O setor de Biologia Molecular do CHTV inclui doseamento de cargas virais (VIH, HCV, HBV), detecção de SARS-CoV-2, amplificação e detecção de vírus ou bactérias, testes multiplex para detecção de vários microrganismos em amostras respiratórias e de LCR etc. Os analisadores e os respectivos parâmetros estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Aparelho e respectivos parâmetros efetuados nos laboratórios de Imunologia e Biologia Molecular.

Equipamento	Análises efetuadas
Cobas® 480 X e Z (Roche Diagnostics)	Cargas virais HIV, HCV, HBV
FilmArray® (BioFire Diagnostics, BioMerieux)	Painel Respiratório, Painel Encefalite
GeneXpert® (Cepheid, Werfen)	<u>Mutações</u> : BCR-ABL, Fator II e V; <u>Microrganismos infecciosos</u> : HPV, GRIPE A + B + RSV, Carpanemesases, BK, Sars-Cov-2

ImmunoCap Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific)	<p><u>Autoimunidade:</u> ENA, dsDNA, ANCA- MPO e PR3, β2-glicoproteína IgG e IgM, Cardiolipina IgG e IgM, Transglutaminase IgA e IgG, Gliadina IgA e IgG, Membrana Glomerular Basal, Fator Intrínseco, Células Parietais, CCP, ASCA IgA e IgG, Calprotectina</p> <p><u>Alergologia:</u> IgE específica, IgG específica</p>
Auto-LiPA™ 48 (Innogenetics)	<p>Identificação ENA, M2, Nucleolar, Miosite. Detecção HLA, MTHFR, Genótipo HCV. Teste confirmatório HCV e HIV.</p>
Termocicladores	Amplificação de ácidos nucleicos
Mago 4 Plus (ERBA)	<p>Autoimunidade: Hep2-<i>screening</i> ANA (diluição 1/60)</p> <p><u>Serologia:</u> <i>Treponema pallidum</i> IgM, <i>Chlamydia trachomatis</i> IgG e IgM, <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgG e IgM.</p>

11. Conclusão

O estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do CHTV foi fundamental para a minha formação acadêmica e profissional. Permitiu aprofundar os conhecimentos adquiridos durante o primeiro ano do mestrado em Bioquímica, bem como obter novos conhecimentos essencialmente da parte prática, aproximando-me mais do que é o mercado de trabalho na área da saúde, uma vez que tive a possibilidade de acompanhar os diferentes setores do laboratório.

Durante todo este percurso nem sempre foi fácil conseguir acompanhar a rotina laboratorial. No entanto acho imprescindível a realização de um estágio numa área como esta em que a parte prática é fulcral para aplicar toda a teoria aprendida durante os anos anteriores.

Acredito que a realização do estágio possibilitou a aquisição de novas competências, nomeadamente o trabalho de equipa, organização, maior destreza em elaborar técnicas manuais e capacidade de pensamento crítico sobre resultados obtidos.

Para concluir, este estágio permitiu compreender que a bioquímica é transversal a todas as áreas presentes.

Capítulo 2: Projeto de Investigação

1. Introdução

1.1 Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é responsável por centenas de milhares de mortes anualmente, e a projeção do seu aumento fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) a reconhecesse como uma grande ameaça à saúde global ¹²⁰.

Os antimicrobianos matam ou inibem microrganismos, sendo ferramentas clínicas essenciais no tratamento de infecções, contudo a resistência continua a surgir, diversificar e espalhar-se rapidamente. Globalmente, as infecções resistentes a antimicrobianos matam pelo menos 700.000 pessoas a cada ano e dentro de 30 anos estão previstas cerca de 10.000.000 mortes por ano, excedendo em muito as provocadas por cancro. Estima-se que este fenómeno de resistência se torne no maior desafio na área da saúde até 2050 ¹²¹.

Os antibióticos são um subconjunto de antimicrobianos que inibem funções essenciais das bactérias. Os antibióticos são produtos naturais ou derivados e são amplamente utilizados para tratar e prevenir infecções bacterianas em humanos. Populações bacterianas resistentes espalham-se quando os antibióticos exercem pressões seletivas que favorecem a resistência. Os antibióticos também podem eliminar populações microbianas suscetíveis, reduzindo a competição e expandindo os recursos disponíveis para bactérias resistentes. Além disso, a resistência aos antibióticos está a espalhar-se rapidamente porque, uma vez que um gene de resistência evolui numa bactéria, este pode espalhar-se para outras células e outras espécies bacterianas ¹²².

Novos fatores de resistência a antibióticos podem surgir em qualquer lugar, a qualquer momento. O espantoso número de células bacterianas na Terra, estimado em cerca de 10^{30} , fornece uma imensa variabilidade genética e oportunidades para mutações, rearranjos e transferência horizontal de genes. Assim, novos fatores de resistência provavelmente aparecem regularmente, embora nunca detetemos a grande maioria desses eventos. Os fatores de resistência geralmente estão associados a algum custo de condicionamento físico. Esse custo, como já foi mencionado, pode ser particularmente alto para genes que fornecem novas funções de resistência a uma bactéria, pois a sua expressão pode não ser suficientemente ajustada e os seus produtos podem interferir com outras funções celulares

¹²⁰.

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria com um lugar especial no mundo microbiológico, pois pode causar infecções graves em humanos e animais, mas também representa uma parte significativa da microbiota autóctone dos diferentes hospedeiros. É uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família das *Enterobacterales*, considerada um bacilo quanto à sua classificação morfológica e pode ser imóvel ou móvel por flagelos¹²³.

A maioria das estirpes desta espécie bacteriana são comensais inofensivos que vivem numa associação mutuamente benéfica com os seus hospedeiros e raramente causam doenças. *E. coli* é, no entanto, uma espécie particularmente complexa, tendo-se diversificado em estirpes patogénicas¹²⁴. Numerosos fatores de virulência (FV) estão relacionados com a patogenicidade de *E. coli* e com uma ampla gama de atividades patogénicas. Além dos FVs, a resistência antimicrobiana e a formação de biofilme também dificultam a eliminação de microrganismos do corpo humano¹²⁵.

1.2.1 *E coli* infecciosa

E. coli faz parte da flora natural de muitos animais. As infeções humanas ocorrem através do consumo de produtos alimentares contaminados (carne mal cozida ou produtos frescos contaminados), água contaminada com dejetos animais ou humanos, ou através da disseminação direta de pessoa para pessoa devido a carências de higiene¹²⁶.

O trato gastrointestinal humano é normalmente habitado por *E. coli*, razão pela qual são as espécies bacterianas mais comumente encontradas no isolamento de cultura fecal. Quando as estirpes adquirem material genético adicional, podem tornar-se patogénicas e circular amplamente por todo o corpo. Os clones patológicos são divididos em dois grandes grupos: intestinais (entre os agentes patogénicos entéricos mais virulentos) e extraintestinais (menos presentes, mas não menos perigosos)¹²⁷.

As estirpes de *E. coli* são o agente etiológico mais frequente nas infeções do trato urinário (ITUs) e ainda na sépsis¹²⁶. *E. coli* é a principal causa de ITUs que podem surgir como bacteriúria assintomática, cistite e pielonefrite, além de prostatite nos homens. *E. coli* uropatogénica (UPEC) é o agente etiológico em 75% das ITUs não complicadas e 65% das ITUs complicadas. Estas últimas estão geralmente associadas a cateteres, alterações estruturais do trato urinário, imunossupressão ou exposição a antimicrobianos¹²⁸. Outro produto biológico onde é mais comum aparecer *E. coli* é no sangue, responsável por aproximadamente 20% de todos os isolados clinicamente significativos deste produto¹²⁷.

Dentro de *E. coli* entérica, esta é subdividida em diferentes serotipos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e Vero *E. coli* produtora de citotoxina (VTEC) ou *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Os surtos de intoxicação alimentar têm sido particularmente associados às estirpes VTEC e, em menor grau a EPEC, ETEC e EAggEC¹²⁴.

Vários serotipos de EHEC são frequentemente associados a doenças humanas, como O26:H11, O91:H21, O111:H8, O157:NM e O157:H7. A infeção por *E. coli* O157:H7 é um grande problema de saúde pública na América do Norte, Europa e noutras áreas do mundo. Embora o número total de casos de infeções por *E. coli* O157:H7 seja menor do que os de outros patógenos entéricos, como *Salmonella* ou *Campylobacter spp.*, as doenças causadas por este serotipo apresentaram taxas de hospitalização e mortalidade muito maiores. A infeção humana causada por *E. coli* O157:H7 pode exibir um amplo espectro clínico que vai desde casos assintomáticos até ao óbito. A definição dos fatores de virulência e mecanismos da patogénese da *E. coli* O157:H7 tem sido o foco de vários estudos. A produção de Toxina Shiga é considerada essencial, mas não a única responsável pela doença¹²⁹.

1.2.2 Mecanismos de toxicidade

1.2.2.1 Toxina Shiga

A Toxina Shiga (Stx) é uma citotoxina potente e é codificada por bacteriófagos. A Stx é expandida a partir de uma única unidade de transcrição e causa danos numa enorme variedade de células. As Stxs podem ser divididas em dois grupos denominados Stx1 e Stx2. Isolados virulentos de *E. coli* O157:H7 podem expressar apenas Stx1, apenas Stx2 ou ambas as toxinas. Stx2 é conhecida por ser mais tóxica e está mais frequentemente associada a colite hemorrágica ou Síndrome hemolítico-urémica em humanos do que a Stx1. Stx tem uma estrutura conservada que consiste numa subunidade A enzimaticamente ativa (A1) e cinco subunidades B de ligação ao recetor idênticas (B5). A subunidade B5 liga-se aos recetores específicos do hospedeiro globotriaosilceramida (Gb3) ou globotetraosilceramida (Gb4). Após a ligação de Stx (A1B5) à célula hospedeira a toxina é internalizada e sofre transporte retrógrado através dos endossomas iniciais, do complexo de Golgi e do RE; a subunidade A é clivada pela furina no complexo de Golgi, seguida de redução da ligação dissulfeto no RE que liberta o fragmento A1 cataliticamente ativo. A depurinação específica do local do rRNA 28S pela toxina resulta na inibição da síntese proteica e pode induzir a resposta ao stress ribotóxico, a resposta da proteína desdobrada e a apoptose^{129,130}.

1.2.2.2 Elementos Genéticos

A presença de elementos genéticos móveis como plasmídeos, sequências de inserção e transposões contribuem para a flexibilidade do genoma de *E. coli*. A transferência horizontal de genes tem promovido a difusão de genes de resistência a antibióticos entre esta espécie e outros comensais, particularmente em ambientes como o trato intestinal, onde a diversidade de espécies e a densidade populacional bacteriana são elevadas ¹²⁴.

1.2.2.3 Biofilmes

As infecções causadas por *E. coli* podem tornar-se difíceis de erradicar devido à formação de biofilmes. Um biofilme é definido como um agregado de microrganismos que vivem unidos como uma comunidade e são frequentemente encontrados aderidos a superfícies sólidas em ambiente húmido. Os microrganismos num biofilme secretam uma variedade de substâncias protetoras chamadas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que aumentam a sua eficiência de sobrevivência. Biofilmes de *E. coli* são considerados o principal agente causador de muitas infecções intestinais. As células bacterianas densas no biofilme comunicam entre si através da via de sinalização química conhecida como *Quorum Sensing* (QS). Durante o QS, as células bacterianas secretam substâncias autoindutoras (AI) para o meio extracelular e, uma vez alcançada a alta densidade necessária, estas regulam positivamente a formação e maturação do biofilme. As AIs ajudam as células bacterianas no biofilme a secretar fatores de virulência, modular a resposta imunológica do hospedeiro e acumular alterações genéticas. O biofilme dificulta a penetração dos antibióticos convencionais, tornando assim as células menos suscetíveis aos antibióticos ¹³¹.

A formação de biofilmes tem sido associada a dispositivos médicos, incluindo cateteres, ventiladores, lentes de contato e, conseqüentemente, tem um tratamento difícil ¹³¹.

Nas infecções urinárias causadas por *E. coli*, o mecanismo de resistência aos antimicrobianos evoluiu, pois foi observado que há uma diminuição da suscetibilidade a agentes de primeira linha, como nitrofurantoína, ampicilina, fluoroquinolonas e sulfametoxazol/trimetoprim. Portanto, há a necessidade urgente de explorar agentes terapêuticos alternativos de modo a erradicar as doenças originadas especialmente devido à formação de biofilmes de *E. coli* ¹³¹.

1.3 Fosfomicina

A fosfomicina é um antibiótico bactericida, produzido pela primeira vez em 1969, que interfere na síntese da parede celular, atuando sobre as bactérias na fase de crescimento. Desde então, a fosfomicina tem sido utilizada para diferentes indicações, tanto na sua fórmula intravenosa (sal dissódico), quanto oral (sal de cálcio ou trometamol). Nos últimos anos, o uso da fosfomicina aumentou devido à considerável incidência de microrganismos

multirresistentes (MDR) para os quais a fosfomicina constitui, isoladamente ou em combinação, uma alternativa de tratamento. A amoxicilina-clavulanato, os aminoglicosídeos de dose única e a fosfomicina oral são opções alternativas para a cistite por β -lactamases de espectro alargado (ESBL). Portanto, este antibiótico, tem um largo espectro de atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ^{132,133}.

A fosfomicina é considerada um derivado de baixa massa molecular (138 Da) de um ácido fosfórico isolado de culturas de *Streptomyces spp.* (*Streptomyces fradiae*, *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces wedmorensis*). Existe um interesse global em investigar mais acerca da fosfomicina em monoterapia ou em combinação com outros agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções sistêmicas graves devido a bactérias multirresistentes ¹³⁴.

A fosfomicina, utilizada em monoterapia, continua a ser um dos agentes de primeira linha no tratamento de infecções urinárias não complicadas. Sendo um antibiótico oral com atividade bactericida contra agentes patogênicos MDR, com uma absorção oral melhorada após refeições, uma excreção maioritariamente urinária, atingindo uma concentração na urina de 2000 $\mu\text{g/mL}$ e mantendo elevados níveis para além das 24 h, a terapia oral de uma toma única tem sido recomendada em ITUs não complicadas. Este fármaco é também utilizado, em combinação, no tratamento de infecções respiratórias, meningites, otites, infecções neurocirúrgicas, endocardites, bacteriemias, cirurgias cardíacas, infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* amplamente resistentes e *Enterobacterales* portadoras de carbapenemases. A fosfomicina também tem sido utilizada para infecções ginecológicas e osteoarticulares por *Staphylococcus aureus*, tanto resistente como sensível à metilicina, entre outros ^{132,135}.

Em relação às suas propriedades físico-químicas, a fosfomicina é um composto solúvel em água, com baixa ligação às proteínas plasmáticas fazendo com que se dissemine facilmente para a maioria dos tecidos e para o líquido intersticial. Estudos têm demonstrado que a fosfomicina penetra e atinge concentrações relevantes em tecidos inflamados, humor aquoso e vítreo, ossos e pulmões. O composto é excretado quase exclusivamente na urina na forma não metabolizada ¹³⁶ e por esta razão é usado no tratamento de ITUs.

A fosfomicina administrada oralmente é absorvida parcialmente no intestino delgado através de dois mecanismos propostos: (i) um sistema saturável mediado por um transportador associado a um sistema de transporte de fosfato e (ii) um processo não saturável com cinética de primeira ordem. Estudos com fosfomicina mostraram que antes de atingir o intestino delgado, a fosfomicina sofre hidrólise catalisada por ácido no estômago, onde a acidez intragástrica e a taxa de esvaziamento gástrico podem afetar a

extensão da sua degradação hidrolítica e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. Variações entre os indivíduos em relação à acidez intragástrica e à taxa de esvaziamento gástrico podem explicar a alta variabilidade nos níveis séricos alcançados após a administração oral de fosfomicina. O trometamol é um composto orgânico que eleva o pH e, portanto, acredita-se que retarda a hidrólise catalisada por ácido. O volume aparente de distribuição (Vd/F) após a administração de fosfomicina oral é de aproximadamente 100-170 L para um indivíduo de 70 kg. Em contraste, devido à sua maior biodisponibilidade, a fosfomicina administrada por via intravenosa tem um Vd/F relatado de 9-30 L ¹³⁶. As ITU são comuns durante a gravidez devido a alterações hormonais e anátomo-fisiológicas que facilitam o crescimento e disseminação de bactérias no trato urinário materno. Estima-se que 5 a 10% das mulheres desenvolvam algum tipo de ITU durante a gravidez. Um estudo efetuado no Brasil mostrou que a sensibilidade das bactérias isoladas à fosfomicina foi de 89%, o que indica que pode ser uma opção terapêutica eficaz, segura e conveniente para o tratamento de ITUs não complicadas também durante a gravidez ¹³⁷.

1.3.1 Mecanismo de ação

A fosfomicina tem um único mecanismo de ação: bloquear a primeira etapa da síntese do peptidoglicano. O transporte da fosfomicina para o interior da bactéria é realizado através de permeases, como o transportador de glicerol-3-fosfato (GlpT) e o transportador de glicose-6-fosfato (UhpT). Enquanto o GlpT mantém a atividade basal sem ser induzido, o UhpT não tem atividade na ausência de glicose-6-fosfato (G6P). Uma vez dentro da célula bacteriana, a fosfomicina inibe a enzima UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferase (MurA), responsável por catalisar a formação do ácido N-acetilmurâmico (precursor do peptidoglicano) através da ligação de N-acetilglucosamina e fosfoenolpiruvato. A fosfomicina liga-se covalentemente à MurA, inibindo a formação do ácido N-acetilmurâmico e causando assim a lise das células bacterianas ¹³³. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas requerem a formação de ácido N-acetilmurâmico para a síntese de peptidoglicano, o que significa que o espectro de ação da fosfomicina é muito amplo, apresentando atividade contra os principais gêneros na prática clínica, tais como *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacterales*, *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* ¹³².

1.3.2 Mecanismos de resistência

A resistência à fosfomicina pode ser produzida em *Enterobacterales* por três mecanismos separados: comprometimento do transporte, comprometimento do alvo de ação e inativação enzimática. O primeiro desses mecanismos é produzido por mutações nos genes transportadores GlpT e UhpT ou nos genes reguladores correspondentes. O segundo mecanismo é a mutação do gene MurA ou a sua superexpressão. O terceiro mecanismo é a

aquisição de fosX, fosA e os seus genes derivados (fosA2, fosA3, fosA4, fosA5, fosA6) que codificam metaloenzimas, bloqueando assim o acesso da fosfomicina a MurA com a abertura do anel epóxido ou resultando na fosforilação do grupo fosfato da fosfomicina pela ação da quinase. O gene fosA e seus derivados são encontrados nos plasmídeos de β -lactamases de espectro alargado (ESBL), *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemases e no cromossoma de *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Kluyvera spp.* e *P. aeruginosa* ^{138,139}. Vários estudos demonstram que a suscetibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas à fosfomicina, em geral é relativamente alta, mas varia em bactérias individuais e por região geográfica. A atividade em declínio foi observada com o aumento dos padrões de resistência aos β -lactâmicos ¹³⁴.

1.3.3 Sinergia com outros antibióticos

O uso de terapia antimicrobiana combinada é recomendado em determinadas situações doente, incluindo doentes críticos com alto risco de desenvolver uma infecção bacteriana MDR e doentes com infecção por *P. aeruginosa*. A este respeito, a fosfomicina tem um efeito sinérgico *in vitro* de até 100% quando combinada com outros agentes antimicrobianos ¹⁴⁰. Propõe-se que o efeito sinérgico entre a fosfomicina e os antibióticos β -lactâmicos surja da inibição da síntese da parede celular em etapas separadas. A fosfomicina inibe a primeira etapa enzimática, enquanto os antibióticos β -lactâmicos inibem a etapa final do processo de síntese da parede celular. Além disso, a fosfomicina pode modificar a atividade das proteínas de ligação à penicilina, o que pode explicar o efeito sinérgico entre a fosfomicina e os antibióticos β -lactâmicos ¹³⁶.

1.3.4 Método de difusão em disco (método de Kirby Bauer)

O método de difusão em disco, também vulgarmente conhecido como Kirby Bauer, foi desenvolvido em 1966 na Universidade de Washington e ainda é utilizado em muitos laboratórios de microbiologia. Neste método, uma suspensão com concentração padrão de um organismo é semeada sobre agar Mueller Hinton. Posteriormente, discos de papel contendo concentrações fixas de antimicrobianos são colocados sobre a superfície dos meios de cultura. A sensibilidade é visualizada por uma zona de inibição em torno do disco, e os tamanhos dos halos de inibição correlacionam-se com os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) conhecidos. Tal como os valores CIM obtidos por diluições em caldo, os tamanhos dos halos de inibição também têm pontos de corte, definidos pela EUCAST, que determinam se o isolado é sensível, intermédio, ou resistente ^{141,142}. A correlação entre os tamanhos dos halos de inibição e os valores CIM pode ser feita devido à padronização do agar Mueller Hinton. Fatores como o pH, a profundidade do agar e a concentração de íons são normalizados no agar Mueller Hinton para o teste Kirby Bauer evitando variação no tamanho do halo ¹⁴³.

2. Objetivos do Projeto de Investigação

A carta VITEK® 2 AST-355 (BioMérieux) é utilizada na rotina laboratorial para determinar a sensibilidade da *E. coli* à fosfomicina, apresentando pontos de corte de $S \leq 16$ e $R > 16$ µg/ml. Recentemente, a EUCAST definiu uma CIM para a fosfomicina oral em *E. coli* de $S \leq 8$ e $R > 8$ mg/L, o que levanta algumas dúvidas sobre a interpretação da sensibilidade à fosfomicina quando utilizada a carta VITEK® 2 AST-355 ¹⁴⁴.

Deste modo, o objetivo deste projeto de investigação foi avaliar a utilidade de um sistema comercial automatizado de microdiluição em caldo – VITEK® 2 (BioMérieux) em estudos de rotina para detetar a sensibilidade de *E. coli* à fosfomicina, comparando-a com o método de difusão em disco, comumente designado como método de Kirby-Bauer.

3. Material e métodos

3.1 Recolha de dados

Foram incluídos no estudo um total de 306 isolados de *E. coli* considerado como agente de infeção do trato urinário, agente etiológico de bacteriemia, isolados de líquidos estéreis e ainda bÍlis, rececionados pelo laboratório de microbiologia do CHTV. A recolha de dados teve início em novembro de 2021, terminando em fevereiro de 2022, no laboratório de microbiologia do CHTV. Ao todo, foram estudadas 306 amostras, das quais 286 de urina, 13 de sangue, 5 de exsudados purulentos, 1 de bÍlis e 1 de líquidos estéreis.

Os isolados foram identificados através de testes bioquímicos realizados pelo sistema VITEK® 2– GN (BioMérieux) e os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram efetuados pelo mesmo sistema automático de microdiluição em caldo (VITEK® 2 - BioMérieux), utilizando as cartas AST-355. A suscetibilidade à fosfomicina foi ainda estudada pelo método de difusão em disco, utilizando discos de fosfomicina 200 µg (Oxoid) sobre meio Mueller Hinton, inoculado com uma suspensão bacteriana 0,5 McFarland. Os resultados foram avaliados de acordo com as recomendações EUCAST.

3.2 Processamento das amostras

As amostras a serem testadas pelo sistema automático de microdiluição em caldo VITEK® 2 (BioMérieux) foram preparadas seguindo o manual do operador do sistema na execução das suspensões para inoculação das cartas de identificação, cartas GN - cartas de identificação de bactérias Gram-negativos fermentadores e não-fermentadores de maior relevância clínica e das cartas teste para determinação da sensibilidade de bacilos Gram negativos aeróbios a agentes antimicrobianos, AST-355.

O método de difusão em disco foi executado seguindo o manual EUCAST: *Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method Version 12.0 January 2022* ¹⁴². Os resultados foram avaliados de acordo com as recomendações deste mesmo manual considerando o diâmetro ≥ 21 mm sensível e < 21 resistente à fosfomicina se for administrada por via intravenosa. Com fosfomicina administrada oralmente considera-se ≥ 24 mm sensível e < 24 resistente ao antibiótico em estudo. Faz-se a medição ignorando possíveis colónias isoladas que possam surgir dentro da zona de inibição ¹⁴¹.

Os métodos a serem utilizados foram explicados previamente no Capítulo 1, o método de difusão em disco na subsecção 6.4.10 e o método automático através do aparelho Vitek 2 (BioMérieux) na subsecção 6.4.9.

Por fim, comparam-se os resultados com a informação obtida no aparelho VITEK® 2 (BioMérieux), que apenas dá informação de sensibilidade e resistência, não fornecendo dados acerca do valor do diâmetro do halo de inibição.

3.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 26.0. Este trabalho baseia-se em estatística descritiva e não inferencial. O único teste realizado, de modo a verificar a presença de variação na distribuição, foi o teste de Qui-Quadrado (X^2). Este teste não necessita de pré realização do teste de Kolmogorov-Sminorv para aferir a normalidade, uma vez que não se enquadra na diferenciação entre testes paramétricos (T-student não emparelhado, ANOVA, T student emparelhado e MANOVA) e testes não paramétricos (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Wilcoxon e Friedman).

4. Resultados

Ao todo foram estudadas 306 amostras, os resultados obtidos mostraram que *E. coli* foi isolado em urina (93,5%), sangue (4,2%), exsudados purulentos (1,6%), bÍlis e líquidos estÉreis (0,3%). O microrganismo em estudo foi isolado em 93,1% dos casos a partir do meio cromogÉneo *chromID™ CPS® Elite* (CPSE) (BioMÉrieux), seguido de 4,9% de gelose de sangue (BioMÉrieux) e 2,0% do meio seletivo MacConkey (BioMÉrieux) (Tabela 18).

Em relaÇão ao mÊs em que o laboratÓrio recebeu as amostras onde foram isoladas *E. coli*, 35,6% foram recebidas em novembro de 2021, 19,6% em dezembro de 2021, 35,3% em janeiro de 2022 e por fim, 9,5% em fevereiro de 2022 (Tabela 18).

Tabela 18: CaracterizaÇão das amostras estudadas em funÇão do produto, meio semeado e mÊs de estudo.

	FrequÊncia	
	n ^o (306)	% (100.0)
Produto		
BÍlis	1	0,3
Exsudato purulento	5	1,6
LÍquido	1	0,3
Sangue	13	4,2
Urina	286	93,5
Meio Semeado		
CPSE	285	93,1
Gelose Sangue	15	4,9
MacConkey	6	2,0
MÊs do estudo (Sementeira e Leitura)		
Novembro 2021	109	35,6
Dezembro 2021	60	19,6
Janeiro 2022	108	35,3
Fevereiro 2022	29	9,5

Relativamente ao estudo dos lotes utilizados, pela anÁlise da Tabela 19, constatamos que o lote 3396228 do meio de Mueller-Hinton foi o mais utilizado com 32,4% das amostras; seguido dos lotes 3384804 e 3422032, ambos com 19,9% das amostras.

JÁ para o meio CPSE, em 19,6% dos casos destaca-se o lote 1008930650, seguido do lote 1009089430 com 19,3% e do lote 1008898490 com 16,3%.

Em relaÇão ao lote do disco de fosfomicina, o lote 64442460 É o mais representado com 52,0% das amostras.

Por fim, e no que refere ao lote da carta de GN (Vitek 2) a maior representaÇão nas amostras estÁ no lote 7951845103 com 84,0%.

Tabela 19: Caracterização dos lotes dos meios, discos e cartas utilizados no estudo das amostras.

	Frequência	
	nº (306)	% (100,0)
Lote Mueller-Hinton		
3359342	16	5,2
3369512	3	1,0
3369658	7	2,3
3384804	61	19,9
3388090	35	11,4
3396228	99	32,4
3415331	23	7,5
3422032	61	19,9
4347920	1	0,3
Lote do Meio Semeado		
3356517	2	0,7
3358651	2	0,7
3376986	5	1,6
3381485	1	0,3
3381495	1	0,3
3407100	8	2,6
3416227	1	0,3
4333839	1	0,3
1008855810	9	2,9
1008898490	50	16,3
1008930650	60	19,6
1008952030	12	3,9
1008980750	26	8,5
1008991070	46	15,0
1009017950	18	5,9
1009089430	59	19,3
1009102150	5	1,6
Lote do Disco de Fosfomicina		
64426514	147	48,0
64442460	159	52,0
Lote da Carta de GN Gram Negativo (Vitek 2)		
7951845103	257	84,0
7951971203	48	15,7
7952019203	1	0,3

Os valores residuais representam a diferença entre os valores observados e os valores estimados, localizando assim a diferença estatisticamente significativa. São valores que variam de -2 a +2, conforme os resultados expressos na Tabela 20. Portanto, analisando a tabela, verifica-se que o tipo de amostra utilizada no estudo, foi majoritariamente urina, variando entre 89,9% e 100,0% para os 4 meses em estudo. Estudando a amostra e os meses em que decorreu o estudo encontram-se diferenças estatísticas bastante significativas ($X^2=26,502$; $**p=0,009$), situação também comprovada pela distribuição dos valores residuais.

Relativamente aos meios de cultura semeados, a maioria dos isolados foram provenientes do meio CPSE, variando entre 82,8% e 98,3%, para os 4 meses em estudo. Quanto à relação entre os meios semeados e os meses, encontram-se diferenças estatisticamente significativas, situação comprovada pela distribuição dos valores residuais e pelo teste de Qui-Quadrado ($X^2=22,218$; $**p=0,001$). Salienta-se, ainda, pela análise destes valores residuais, que essas diferenças se fazem sentir maioritariamente em novembro - MacConkey - e em fevereiro nos outros 2 meios: gelose sangue e CPSE

Tabela 20: Caracterização das amostras estudadas em função do mês da colheita.

Mês do estudo	Novembro 2021		Dezembro 2021		Janeiro 2022		Fevereiro 2022		Residuais				X ²	p
	nº (109)	% (35,6)	nº (60)	% (19,6)	nº (108)	% (35,3)	nº (29)	% (9,5)	N-21	D-21	J-22	F-22		
Produto													26,502	0,009**
Bílis	1	0,9%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1,3	-	-	-		
Exsudado purulento	4	3,7%	0	0,0%	1	0,9%	0	0,0%	2,1	-	-	-		
Líquido	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	3,4%	-	-	-	3,1		
Sangue	6	5,5%	0	0,0%	3	2,8%	4	13,8%	0,8	-	-	2,7		
Urina	98	89,9%	60	100,0%	104	96,3%	24	82,8%	-	1,8	0,9	-		
Meio Semeado													22,218	0,001**
CPSE	98	89,9%	59	98,3%	104	96,3%	24	82,8%	-	1,8	1,6	-		
GS	5	4,6%	1	1,7%	4	3,7%	5	17,2%	-	-	-	3,2		
Mac	6	5,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3,3	-	-	-		

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Quanto à sensibilidade aferida, obteve-se total concordância entre os resultados obtidos pelo sistema automático de microdiluição em caldo (VITEK® 2 - BioMérieux) e pelo método de difusão em disco (método de Kirby Bauer) (ver Anexo 1).

Em ambos os métodos apenas 1,0% das amostras (3 amostras) apresentaram resistência à fosfomicina e 99,0% mostraram-se sensíveis ao fármaco em estudo, não havendo discrepância entre os resultados obtidos pelos dois métodos (Tabela 21).

O sistema VITEK® 2 (BioMérieux) apresenta um ponto de corte máximo de 32µg/ml para a sensibilidade de *Enterobacterales* à fosfomicina, não fazendo a distinção entre a utilização oral ou intravenosa deste fármaco. Por sua vez, EUCAST apresenta um ponto de corte de 24mm para o método de difusão em disco e 8mg/L como CIM, para a fosfomicina oral no tratamento de ITUs não complicadas e um ponto de corte de 32mg/L e 21mm para a

utilização IV de fosfomicina. Deste modo, verifica-se que o sistema VITEK® 2 (BioMérieux) apresenta um ponto de corte apenas adequado para a utilização intravenosa da fosfomicina, não devendo ser usado no estudo da sensibilidade em infecções não complicadas do trato urinário. No entanto, pela análise da Tabela 21, e apesar do pequeno número de isolados resistentes, pode verificar-se que os resultados apresentados pelo VITEK® 2 e os resultados obtidos pelo método da difusão em disco com base nas normas EUCAST não constituíram matéria de discordância durante o estudo.

Tabela 21: Estudo da concordância dos métodos em estudo.

	Frequência	
	nº (306)	% (100,0)
Resultado por difusão em disco		
Resistente	3	1,0
Sensível	303	99,0
Resultado VITEK2		
Resistente	3	1,0
Sensível	303	99,0

5. Discussão de Resultados

Vários estudos *in vitro* demonstraram que a fosfomicina tem uma excelente atividade contra muitas bactérias MDR Gram negativas, incluindo ESBL, isoladas de doentes com ITU. Para ser categorizado corretamente nos relatórios clínicos, o uso clínico da fosfomicina requer testes *in vitro* dos fármacos ¹⁴⁵.

Pela análise dos resultados obtidos, no que se refere à sensibilidade aferida, observou-se correlação entre os resultados obtidos pelo sistema automático de microdiluição em caldo VITEK® 2 (BioMérieux) e pelo método Kirby Bauer. Apesar da limitação dos pontos de corte do VITEK® 2 (BioMérieux), com uma CIM superior ao recomendado pela EUCAST, os resultados evidenciaram que Vitek2 AST-355 é uma opção aceitável para usar na rotina laboratorial quando se determina a suscetibilidade de *E. coli* à fosfomicina.

No entanto, pela análise da bibliografia consultada ^{144,146,147}, verifica-se que o estudo carece de maior número de isolados resistentes à fosfomicina, de modo a confirmar a concordância entre os dois métodos em estudo e as recomendações EUCAST neste grupo de amostras.

Novamente, pela análise de estudos similares ^{144,146,147}, sugere-se ser pertinente alargar este estudo a outros métodos, nomeadamente a determinação da CIM por E-test em amostras resistentes à fosfomicina, como também o alargamento do estudo a outros microrganismos da família *Enterobacterales*, agentes comuns de ITUs.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

Os métodos automatizados baseados na diluição em caldo são cada vez mais utilizados por muitos laboratórios de microbiologia clínica para determinar a sensibilidade aos antimicrobianos. Assim sendo, é vital que estes métodos sejam capazes de determinar com precisão os padrões corretos de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos a serem testados.

Com este trabalho concluiu-se que o sistema VITEK® 2 (BioMérieux), utilizado no laboratório de Patologia Clínica do CHTV, consegue detetar a suscetibilidade de *E. coli* à fosfomicina com a mesma precisão que o método tradicional de difusão em disco - Kirby Bauer, demonstrando-se assim a possibilidade de se adotar em rotina apenas o método automático para o estudo de fosfomicina em infeções por *E. coli*. No entanto, serão necessários efetuar mais estudos acerca deste tema, aumentando o número de amostras resistentes e alargando para outras espécies microbianas.

Bibliografia

- (1) Henry, J. B. (2012) Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais (Manole, Ed.) 21ª edição.
- (2) Laposata, M., and Dighe, A. (2007) “Pre-pre” and “post-post” analytical error: High-incidence patient safety hazards involving the clinical laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 712–719.
- (3) Pritt, B. S., Bowler, C. A., and Theel, E. S. (2020) Fellowship Training for the Future Clinical Microbiology Laboratory Director. *Clin. Lab. Med.* 40, 521–533.
- (4) Marshall, W. J., Lapsley, M., Day, A., and Ayling, R. (2016) BIOQUÍMICA CLÍNICA Aspectos clínicos e metabólicos (Elsevier Saunders, Ed.) 3ª edição.
- (5) Hawkins, R. (2011) Managing the Pre- and Post-analytical Phases of the Total Testing Process. *Ann. Lab. Med.* 2, 16.
- (6) Lima-Oliveira, G., Volanski, W., Lippi, G., Picheth, G., and Guidi, G. C. (2017) Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 77, 153–163.
- (7) Krleza, J. L., Honovic, L., Tanaskovic, J. V., Podolar, S., Rimac, V., and Jokic, A. (2019) Post-analytical laboratory work: National recommendations from the working group for post-analytics on behalf of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine. *Biochem. Medica* 29, 228–261.
- (8) Jassam, N., Lindsay, C., Harrison, K., Thompson, D., Bosomworth, M. P., and Barth, J. H. (2011) The implementation of a system for managing analytical quality in networked laboratories. *Ann. Clin. Biochem.* 48, 136–146.
- (9) Cooper, G. (2011) Basic Lessons in Laboratory Quality Control. *Bio-Rad Lab.* 62.
- (10) Poh, D. K. H., Lim, C. Y., Tan, R. Z., Markus, C., and Loh, T. P. (2021) Internal quality control: Moving average algorithms outperform Westgard rules. *Clin. Biochem.* 98, 63–69.
- (11) Lisboa, T. (2016) Erros e incertezas experimentais. Disponível em <https://courses.mooc.tecnico.ulisboa.pt/pt-pt/> Acedido a 05/02/2022.
- (12) Badrick, T. (2021) Integrating quality control and external quality assurance. *Clin. Biochem.* 95, 15–27.
- (13) INSA. (2009) Avaliação externa da qualidade 1–11.
- (14) Beckert, S. F. (2018) Critical analysis of Calibration and Measurement Capabilities (CMC) presented in accreditation scopes. *J. Phys. Conf. Ser.* 1065, 0–4.
- (15) IPAC. Disponível em <http://www.ipac.pt/> Acedido a 06/02/2022.
- (16) APCER. Disponível em <https://www.apcergroup.com/pt/> Acedido a 06/02/2022.
- (17) WHO guidelines on drawing blood : best practices in phlebotomy 1–105.
- (18) Sarstedt. Tubos para colheita de sangue venoso S-Monovette. Disponível em <https://www.sarstedt.com/pt/produtos/diagnostico/sangue-venoso/s-monovetter/> Acedido a 25/01/2022.
- (19) François, D., Masure, A., Atallah, N., Touil, L., and Vasse, M. (2014) Underestimation of platelet count on magnesium salt-anticoagulated samples. *Clin. Chem. Lab. Med.* 52, 95–97.
- (20) Bain, B. J. (2016) Células Sanguíneas - Um Guia Prático. *BMC Public Health* (Artmed, Ed.) 5ª edição.

- (21) Marques-Garcia, F. (2020) Methods for hemolysis interference study in laboratory medicine - a critical review. *Electron. J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* 31, 85–97.
- (22) Mainali, S., Merrill, A. E., and Krasowski, M. D. (2021) Frequency of icteric interference in clinical chemistry laboratory tests and causes of severe icterus. *Pract. Lab. Med.* 27, e00259.
- (23) Krasowski, M. D. (2019) Educational Case: Hemolysis and Lipemia Interference With Laboratory Testing. *Acad. Pathol.* 6.
- (24) Wang, Y. K., Kuo, F. C., Liu, C. J., Wu, M. C., Shih, H. Y., Wang, S. S. W., Wu, J. Y., Kuo, C. H., Huang, Y. K., and Wu, D. C. (2015) Diagnosis of helicobacter pylori infection: Current options and developments. *World J. Gastroenterol.* 21, 11221–11235.
- (25) BioMérieux. Meios de cultura da Biomerieux. Disponível em <http://www.biomerieux-culturemedia.com/#> Acedido a 28/12/2021.
- (26) Jorge, R. (2004) Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Programa Nacional de Controlo de Infecção. *Microbiol.*
- (27) BD Diagnostic Systems. (2016) BD BBL MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 mL with BD BACTEC MGIT 960 Supplement Kit L000180JAA(04). *Packag. Inser.* 28.
- (28) Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Tenover, M. C. (2016) Medical Microbiology (ELSEVIER, Ed.) 8th ed.
- (29) BioMérieux. Coloração de Gram automática. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/previr-color-gram> Acedido a 19/01/2022.
- (30) Thairu, Y., Usman, Y., and Nasir, I. (2014) Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African J. Med.* 1, 168.
- (31) Joanne Willey, L. S. and C. J. W. (2007) Prescott, Harley, and Klein's Microbiology 7th ed. McGraw-Hill Education.
- (32) Biorad. (2015) BULA PASTOREX STAPH-PLUS 1–7.
- (33) Dickinson, B. (2013) BULA BBL DrySlide Indole 5–7.
- (34) BioMérieux. API. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/gama-de-galerias-apis> Acedido a 13/02/2022.
- (35) Biorad. (2017) BULA Pastorex Strep 1–12.
- (36) Cartas de Identificação e Antibiograma da Biomerieux. Disponível em <https://www.biomerieux.com/> Acedido a 15/02/2022.
- (37) Lamy, B., Dargère, S., Arendrup, M. C., Parienti, J. J., and Tattevin, P. (2016) How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art. *Front. Microbiol.* 7, 1–13.
- (38) Rita, M., and Araujo, E. De. (2012) Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados 8–19.
- (39) BACTEC, Vacutainer, and Becton Dickinson and Company. (2001) Automated Blood Culture BACTEC 1–21.
- (40) Dickinson, B. Garrafas de hemocultura. Disponível em <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/solutions/capabilities/bd-bactec-Blood-culture-media> Acedido a 22/12/2021.
- (41) Silva, A., Oliveira, F., and Ramos, M. (2009) Infecção associada ao Cateter Venoso Central – Revisão da Literatura. *Rev. Ref.*

- (42) Ronald, A. (2003) The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens. *Disease-a-Month* 49, 71–82.
- (43) Angoti, G., Goudarzi, H., Hajizadeh, M., and Tabatabaai, Z. (2016) Bacteria Isolated from Urinary Tract Infection among Patients and Determination of the Antibiotic Susceptibility Patterns of the Gram Negative Bacteria in Iran. *Nov. Biomed.* 4, 1–4.
- (44) Cristino, J. M. (2017) Manual de colheitas 7, 97.
- (45) Coulter, B. iQ200 BC. Disponível em <https://www.beckmancoulter.com/products/urinalysis/iq200> Acedido a 23/12/2021.
- (46) Coulter, B. iChemVELOCITY BC. Disponível em <https://www.beckmancoulter.com/products/urinalysis/ichemvelocity> Acedido a 23/12/2021.
- (47) Rotheram, S., Cooper, J., Barr, B., and Whitehead, M. (2021) How are inequalities generated in the management and consequences of gastrointestinal infections in the UK? An ethnographic study. *Soc. Sci. Med.* 282, 114131.
- (48) Laborclin. (2019) BULA mCCDA CAMPYLOBACTER AGAR 1–3.
- (49) Kouhsari, E., Abbasian, S., Sedighi, M., Yaseri, H. F., Nazari, S., Bialvaei, A. Z., Dahim, P., Mirzaei, E. Z., and Rahbar, M. (2018) Clostridium difficile infection: A review. *Rev. Med. Microbiol.* 29, 103–109.
- (50) TECHLAB. (2012) BULA C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE.
- (51) Farooq, P. D., Urrunaga, N. H., Tang, D. M., and Rosenvinge., E. C. von. (2015) Pseudomembranous Colitis. *Disease-a-Month* 37.
- (52) Ladabaum, U. (2018) Occult blood in faeces: A window into health beyond the colorectum? *Gut* 67, 2079–2080.
- (53) Meridian Healthcare. (2010) BULA One-Step FOB Test For in vitro Diagnosis 1–3.
- (54) Ozsari, T., Bora, G., Kaya, B., and Yakut, K. (2016) The prevalence of rotavirus and adenovirus in the childhood gastroenteritis. *Jundishapur J. Microbiol.* 9.
- (55) Kaplon, J., Théry, L., Bidalot, M., Grangier, N., Frappier, J., and Aho, S. (2021) Diagnostic Accuracy of Four Commercial Triplex Immunochromatographic Tests for Rapid Detection of Rotavirus, Adenovirus, and Norovirus in Human Stool Samples. *J. Clin. Microbiol.*
- (56) Haque, R. (2007) Human intestinal parasites. *J. Heal. Popul. Nutr.* 25, 387–391.
- (57) Epitope Diagnostics. (2014) BULA Fecal Ova/Parasite Concentration Kit 1.
- (58) An, S., Tonani, K. A. A., Fregonesi, B. M., Mariano, A. P., Ferrassino, D. B., Trevilato, M. B., Rodrigues, R. B., and Segura-mu, S. I. (2012) Adaptation of Ritchie ' s Method for Parasites Diagnosing with Minimization of Chemical Products 2012.
- (59) Pellati, D., Mylonakis, I., Bertoloni, G., Fiore, C., Andrisani, A., Ambrosini, G., and Armanini, D. (2008) Genital tract infections and infertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 140, 3–11.
- (60) Amini, L., Kahrobaie, M., Amiri-Farahani, L., and Haghani, H. (2020) The relationship between health life style and spermogram Indicators among infertile men: Preliminary data. *BMC Res. Notes* 13, 1–5.
- (61) Direção-Geral da Saúde. (2011) Saúde Reprodutiva Infertilidade. *Norma nº 003/2011* 19/01/2011 1, 9.
- (62) Mohanasundari, C., Anbalagan, S., Srinivasan, K., and Kandasamy, S. (2021) Investigation on

- antibiotic resistance property of bacteria enumerated from human pus samples. *Mater. Today Proc.*
- (63) Biopsy. Disponível em <https://www.nhs.uk/conditions/biopsy/> Acedido a 21/12/2021.
- (64) Kumar, K. What Is the Function of Bile? Disponível em https://www.medicinenet.com/what_is_the_function_of_bile/article.htm Acedido a 21/12/2021.
- (65) BioMérieux. (2014) BULA chromID ® MRSA agar / chromID ® S. aureus agar (MRSA/SAID) 43466 1–6.
- (66) BioMérieux. Meio Streptococcus agalactiae. Disponível em <https://www.biomerieux.com.br/produto/chromidtm-strepto-b> Acedido a 22/12/2021.
- (67) WHO. Meningitis. Disponível em https://www.who.int/health-topics/meningitis#tab=tab_1 Acedido a 22/12/2021.
- (68) CARROLL, K. C., and ADAMS, L. L. (2016) Lower respiratory tract infections. *Microbiol. Spectr.* 18.
- (69) Patel, V. B., Theron, G., Lenders, L., Matinyena, B., Connolly, C., Singh, R., Coovadia, Y., Ndung'u, T., and Dheda, K. (2013) Diagnostic Accuracy of Quantitative PCR (Xpert MTB/RIF) for Tuberculous Meningitis in a High Burden Setting: A Prospective Study. *PLoS Med.* 10.
- (70) Lima, T. M. de, Belotti, N. C. U., Nardi, S. M. T., and Pedro, H. da S. P. (2017) Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 8, 65–76.
- (71) Khan, S., Priti, S., and Ankit, S. (2015) Bacteria etiological agents causing lower respiratory tract infections and their resistance patterns. *Iran. Biomed. J.* 19, 240–246.
- (72) Racine, R., and Winslow, G. M. (2009) IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunol. Lett.* 125, 79–85.
- (73) BIO-RAD. (2014) BULA Brucella Wright 4.
- (74) BiO-RAD. (2014) BULA Brucella Rose Bengale 4.
- (75) Widal Reaction. Disponível em <https://microbenotes.com/widal-test/#what-is-widal-test> Acedido a 04/07/2022.
- (76) Luo, Y., Xie, Y., and Xiao, Y. (2021) Laboratory Diagnostic Tools for Syphilis: Current Status and Future Prospects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–12.
- (77) D'Onofrio, G. (2021) Full- field hemocytometry. Forty years of progress seen through Clinical and Laboratory Hematology and the International Journal of Laboratory Hematology 8.
- (78) Hoffbrand, A., Moss, P., and Pettit, J. (2008) Fundamentos em Hematologia. *Rev. Biol. Trop.* (Artmed, Ed.) 7ª edição.
- (79) Groarke, E. M., and Young, N. S. (2019) Aging and Hematopoiesis. *Clin. Geriatr. Med.* 35, 285–293.
- (80) Celkan, T. T. (2020) What does a hemogram say to us? *Turk Pediatr. Ars.* 103–116.
- (81) Coulter, B. DxH 600 Beckman Coulter. Disponível em <https://www.beckmancoulter.com/products/hematology/dxh-600> Acedido a 06/03/2022.
- (82) Coulter, B. O Princípio de Coulter. Disponível em <https://www.beckman.pt/resources/technologies/flow-cytometry/history/coulter-principle> Acedido a 06/03/2022.

- (83) Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., and Safo, M. K. (2020) Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem.* 94, 345–382.
- (84) Wennecke, G. (2004) Hematocrit - a review of different analytical methods. *Acutecaretesting.Org* 1–9.
- (85) Salvagno, G. L., Sanchis-Gomar, F., Picanza, A., and Lippi, G. (2015) Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 52, 86–105.
- (86) Mei, Y., Liu, Y., and Ji, P. (2021) Understanding terminal erythropoiesis: An update on chromatin condensation, enucleation, and reticulocyte maturation. *Blood Rev.* 46, 100740.
- (87) Hu, W., Zhang, P., Su, Q., Li, D., Hang, Y., Ye, X., Guan, P., Dong, J., and Lu, Y. (2020) Peripheral leukocyte counts vary with lipid levels, age and sex in subjects from the healthy population. *Atherosclerosis* 308, 15–21.
- (88) Wechsler, M. E., Munitz, A., Ackerman, S. J., Drake, M. G., Jackson, D. J., Wardlaw, A. J., Dougan, S. K., Berdnikovs, S., Schleich, F., Matucci, A., Chanez, P., Prazma, C. M., Howarth, P., Weller, P. F., and Merkel, P. A. (2021) Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin. Proc.* 96, 2694–2707.
- (89) Holinstat, M. (2017) Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.* 36, 195–198.
- (90) Born, G. (2012) Platelets: Past, present and future. *Handb. Exp. Pharmacol.* 210.
- (91) LaboratoryInfo. (2022) Wright's Stain – Procedure, Principle, Components, Uses and Blood smear. Disponível em <https://laboratoryinfo.com/wrights-stain/> Acedido a 23/03/2022.
- (92) Yale, S. H., Bray, C., Bell, L. N., Liang, H., Haykal, R., Kaiksow, F., and Mazza, J. J. (2016) Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine. *Wis. Med. J.* 115, 317–321.
- (93) Curvers, J., Kooren, J., Laan, M., Van Lierop, E., Van De Kerkhof, D., Scharnhorst, V., and Herruer, M. (2010) Evaluation of the Ves-Matic cube 200 erythrocyte sedimentation method: Comparison with westergren-based methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 134, 653–660.
- (94) Pieri, M., Pignalosa, S., Perrone, M. A., Russo, C., Noce, G., Perrone, A., Terrinoni, A., Massoud, R., and Bernardini, S. (2021) Evaluation of the Diesse Cube 30 touch erythrocyte sedimentation method in comparison with Alifax test 1 and the manual Westergren gold standard method. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 81, 181–186.
- (95) Grover, S. P., and Mackman, N. (2019) Intrinsic pathway of coagulation and thrombosis: Insights from animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 331–338.
- (96) Winter, W. E., Flax, S. D., and Harris, N. S. (2017) Coagulation testing in the core laboratory. *Lab Med.* 48, 295–313.
- (97) Johari, V., and Loke, C. (2012) Brief Overview of the Coagulation Cascade. *Disease-a-Month* 58, 421–423.
- (98) Dorgalaleh, A., Favalaro, E. J., Bahraini, M., and Rad, F. (2021) Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR). *Int. J. Lab. Hematol.* 43, 21–28.
- (99) Laboratory, I. (2012) BULA ACL TOP. One family of One standard of testing . 8.
- (100) Werfen. ACL TOP 700. Disponível em <https://www.werfen.com/na/en/hemostasis-diagnostics/coagulation-instruments-system-acl-top-family-series>. Acedido a 07/04/2022.

- (101) Rasmussen, K. L., Philips, M., Tripodi, A., and Goetze, J. P. (2020) Unexpected, isolated activated partial thromboplastin time prolongation: A practical mini-review. *Eur. J. Haematol.* *104*, 519–525.
- (102) Laboratory, I. (2008) BULA PT-Fibrinogen HS PLUS. *Instrum. Lab. Inser. kit 3125*.
- (103) Linkins, L. A., and Takach Lapner, S. (2017) Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. *Int. J. Lab. Hematol.* *39*, 98–103.
- (104) Weitz, J. I., Fredenburgh, J. C., and Eikelboom, J. W. (2017) A Test in Context: D-Dimer. *J. Am. Coll. Cardiol.* *70*, 2411–2420.
- (105) Laboratory, I. (2007) BULA D-Dimer *3125*, 24–26.
- (106) Rezaie, A. R., and Giri, H. (2020) Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J. Thromb. Haemost.* *18*, 3142–3153.
- (107) Laboratory, I. (2003) BULA Antithrombin HemosIL™ *150*, 5–6.
- (108) Marlar, R. A., and Gausman, J. N. (2014) Laboratory testing issues for protein C, protein S, and antithrombin. *Int. J. Lab. Hematol.* *36*, 289–295.
- (109) Laboratory, I. (2008) BULA HemosIL - Protein C *2443*, 3.
- (110) Laboratory, I. (2013) BULA Free Protein S *2443*, 2–4.
- (111) Molhoek, J. E., De Groot, P. G., and Urbanus, R. T. (2018) The Lupus Anticoagulant Paradox. *Semin. Thromb. Hemost.* *44*, 445–452.
- (112) Laboratory, I. (2014) BULA Silica Clotting Time *3125*, 1–2.
- (113) Pengo, V., Bison, E., Banzato, A., Zoppellaro, G., Jose, S. P., and Denas, G. (2017) Lupus Anticoagulant Testing: Diluted Russell Viper Venom Time (dRVVT), in *Chapter 14: Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, pp 169–176.
- (114) Pastuschek, J., Bär, C., Göhner, C., Budde, U., Leidenmuehler, P., Groten, T., Schleußner, E., and Markert, U. R. (2021) Ex vivo human placental transfer study on recombinant Von Willebrand factor (rVWF). *Placenta* *111*, 69–75.
- (115) Laboratory, I. (2004) BULA von Willebrand Factor Antigen *3125*, 1–3.
- (116) Bento, L. C., Correia, R. P., Pedro, E. C., Alexandre, A. M., Vaz, A. C., Schimidell, D., Barroso, R. S., and Bacal, N. S. (2019) Desempenho do citômetro de fluxo Aquios CL na quantificação automatizada de subpopulações linfocitárias. *J Bras Patol Med Lab.* *55*, 384–389.
- (117) Coulter, B. (2016) Cytomics FC 500 With CXP Software BULA.
- (118) Reed, R. (2016) Clinical Chemistry Learning Guide Series. *Abbot* 3–64.
- (119) Turgeon, M. (2014) Immunology and Serology in Laboratory medicine. *Angew. Chemie Int. Ed.* *6(11)*, 951–952. (Elsevier, Ed.) 5th ed.
- (120) Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., and Larsson, D. G. J. (2018) Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* *42*, 68–80.
- (121) O' Neill, J. (2014) Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. *Wellcome Trust* *1*, 20.
- (122) Lerminiaux, N. A., and Cameron, A. D. S. (2019) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can. J. Microbiol.* *65*, 34–44.
- (123) Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., and Schwarz, S. (2018) Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. *Microbiol. Spectr.* *6*, 1–27.

- (124) Ramos, S., Silva, V., de Lurdes Enes Dapkevicius, M., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., and Poeta, P. (2020) Escherichia coli as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production. *Animals* 10, 1–15.
- (125) Kobayashi, T., Ikeda, M., Okada, Y., Higurashi, Y., Okugawa, S., and Moriya, K. (2021) Clinical and Microbiological Characteristics of Recurrent Escherichia coli Bacteremia. *Microbiol. Spectr.* 9.
- (126) Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., and Frankel, G. (2012) Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli. *Gut Microbes* 3, 71–87.
- (127) Kumar, A., Francesca Vommaro Leite, A., Sanches Maekawa, L., Kaur, R., Jose Braz Filo, S., Persaud, P., Dastagir Shaikh, J., Kichloo, A., and Shiwalkar, N. (2020) Management of E. coli Sepsis . *E. Coli Infect. - Importance Early Diagnosis Effic. Treat.* 1–29.
- (128) Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., and Hultgren, S. J. (2015) Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 269–284.
- (129) Lim, J. Y., Yoon, J. W., and Hovde., C. J. (2010) A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.* 20, 5–14.
- (130) Pacheco, A. R., Lazarus, J. E., Sit, B., Schmieder, S., Lencer, W. I., Blondel, C. J., Doench, J. G., Davis, B. M., and Waldor, M. K. (2018) CRISPR screen reveals that EHEC's T3SS and Shiga Toxin rely on shared host factors for infection. *MBio* 9, 1–18.
- (131) Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., and Gabrani, R. (2016) Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. *J. Appl. Microbiol.* 121, 309–319.
- (132) Candel, F. J., Matesanz David, M., and Barberán, J. (2019) New perspectives for reassessing fosfomycin: applicability in current clinical practice. *Rev. Esp. Quimioter.* 32, 1–7.
- (133) Díez-aguilar, M. (2019) New microbiological aspects of fosfomycin. *Spanish J. Chemother.* 32, 8–18.
- (134) Falagas, M. E., Athanasaki, F., Voulgaris, G. L., Triarides, N. A., and Vardakas, K. Z. (2019) Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 22–28.
- (135) Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., Van Duin, D., and Clancy, C. J. (2021) Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and Pseudomonas aeruginosa with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. aerug. *Clin. Infect. Dis.* 72, 1109–1116.
- (136) Dijkmans, A. C., Zacarías, N. V. O., Burggraaf, J., Mouton, J. W., Wilms, E. B., van Nieuwkoop, C., Touw, D. J., Stevens, J., and Kamerling, I. M. C. (2017) Fosfomycin: Pharmacological, clinical and future perspectives. *Antibiotics* 6, 1–17.
- (137) Souza, R. B., Trevisol, D. J., and Schuelter-Trevisol, F. (2015) Bacterial sensitivity to fosfomycin in pregnant women with urinary infection. *Brazilian J. Infect. Dis.* 19, 319–323.
- (138) Castañeda-García, A., Blázquez, J., and Rodríguez-Rojas, A. (2013) Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. *Antibiotics* 2, 217–236.

- (139) Kansak, N., Arıcı, N., Adaleti, R., Nakipoglu, Y., and Aksaray, S. (2021) Rapid detection of fosfomicin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. strains isolated from urinary tract infections. *J. Microbiol. Methods* 188, 106296.
- (140) Kastoris, A. C., Rafailidis, P. I., and Falagas, M. E. (2010) Synergy of fosfomicin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol* 359–368.
- (141) EUCAST: Breaking point tables for interpretation of MICs and zone diameters. (2022) Breakpoint Tables 1–110.
- (142) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2021) Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method Version 9.0 January. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Diseases* 0, 1–21.
- (143) Hudzicki, J. (2012) Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *Am. Soc. Microbiol.* 1–13.
- (144) BioMérieux. (2016) BULA Vitek 2 AST-N355 320, 1–3.
- (145) Bielen, L., Likić, R., Erdeljić, V., Mareković, I., Firis, N., Grgić-Medić, M., Godan, A., Tomić, I., Hunjak, B., Markotić, A., Bejuk, D., Tićić, V., Balzar, S., and Bedenić, B. (2018) Activity of fosfomicin against nosocomial multiresistant bacterial pathogens from Croatia: A multicentric study. *Croat. Med. J.* 59, 56–64.
- (146) Karlowsky, J. A., Lagacé-Wiens, P. R. S., Laing, N. M., Baxter, M. R., Adam, H. J., and Zhanel, G. G. (2020) Susceptibility of clinical isolates of *Escherichia coli* to fosfomicin as measured by four in vitro testing methods. *J. Clin. Microbiol.* 58.
- (147) Mezzatesta, M. L., La Rosa, G., Maugeri, G., Zingali, T., Caio, C., Novelli, A., and Stefani, S. (2017) In vitro activity of fosfomicin trometamol and other oral antibiotics against multidrug-resistant uropathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 763–766.
- (148) Silva, P. H. da, Alves, H. B., Comar, S. R., and Henneberg, R. (2015) Fase pré-analítica em hematologia laboratorial, in *Hematologia Laboratorial - Teoria e Procedimentos* (Artmed, Ed.) 1ª edição.
- (149) Tille, P. (2014) *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (ELSEVIER, Ed.) 14th ed.
- (150) Karah, N., Rafei, R., Elamin, W., Ghazy, A., Abbara, A., Hamze, M., and Uhlin, B. E. (2020) Guideline for urine culture and biochemical identification of bacterial urinary pathogens in low-resource settings. *Diagnostics* 10.
- (151) BioMérieux. ID Cards Vitek 2. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-id-cards> Acedido a 15/02/2022.
- (152) BioMérieux. AST Cards Vitek 2. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek-2-ast-cards> Acedido a 15/02/2022.
- (153) E-test da Biomerieux. Disponível em <https://www.biomerieux.pt/produto/etestr> Acedido a 15/02/2022.
- (154) DIAGNOSTICS, B. (2014) BULA Fluorescent Technology in the BD BACTEC™ Automated Blood Culture System 2–4.

Anexos

Anexo 1: Tabela de resultados relativos ao projeto de investigação.

Nº da amostra	Tipo de produto	Meio semeado	Lote de Muller-Hinton	Lote Meio Semeado	Lote disco Fosfomicina (200µg)	Lote carta de TSA Gram Negativos (Vitek® 2)	Data de sementeira	Data da leitura	Valor do halo (mm)	Sensibilidade	Resultado do Vitek® 2
1	Urina	CPSE	3369512	1008855810	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	32	S	S
2	Urina	CPSE	3369512	1008898490	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	33	S	S
3	Urina	CPSE	3369512	1008898490	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	35	S	S
4	Urina	CPSE	3359342	1008898490	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	36	S	S
5	Urina	CPSE	3359342	1008898490	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	39	S	S
6	Urina	CPSE	3359342	1008898490	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	42	S	S
7	Urina	CPSE	3359342	1008898490	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	35	S	S
8	Urina	CPSE	3359342	1008898490	64426514	7951845103	02/nov	03/nov	34	S	S
9	Sangue	GS	3359342	3358651	64426514	7951845103	03/nov	04/nov	37	S	S
10	Urina	CPSE	3359342	1008855810	64426514	7951845103	03/nov	04/nov	35	S	S
11	Urina	CPSE	3359342	1008898490	64426514	7951845103	03/nov	04/nov	40	S	S
12	Urina	CPSE	3359342	1008898490	64426514	7951845103	03/nov	04/nov	36	S	S
13	Urina	CPSE	3359342	108855810	64426514	7951845103	04/nov	05/nov	41	S	S
14	Urina	CPSE	3359342	108855810	64426514	7951845103	04/nov	05/nov	42	S	S
15	Urina	CPSE	3359342	108855810	64426514	7951845103	04/nov	05/nov	39	S	S
16	Urina	CPSE	3359342	108855810	64426514	7951845103	04/nov	05/nov	38	S	S
17	Urina	CPSE	3359342	108855810	64426514	7951845103	04/nov	05/nov	44	S	S
18	Urina	CPSE	3359342	108855810	64426514	7951845103	04/nov	05/nov	42	S	S
19	Urina	CPSE	3359342	108855810	64426514	7951845103	04/nov	05/nov	37	S	S
20	Urina	CPSE	3369658	1008898490	64426514	7951845103	09/nov	10/nov	39	S	S
21	Urina	CPSE	3369658	1008898490	64426514	7951845103	09/nov	10/nov	40	S	S

22	Urina	CPSE	3369658	1008898490	64426514	7951845103	09/nov	10/nov	38	S	S
23	Urina	CPSE	3369658	1008898490	64426514	7951845103	09/nov	10/nov	41	S	S
24	BÍlis	GS	3369658	3358651	64426514	7951845103	09/nov	10/nov	40	S	S
25	Abcesso	Mac	3369658	3376986	64426514	7951845103	09/nov	10/nov	37	S	S
26	Abcesso	Mac	3369658	3376986	64426514	7951845103	09/nov	10/nov	36	S	S
27	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	41	S	S
28	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	36	S	S
29	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	38	S	S
30	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	38	S	S
31	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	35	S	S
32	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	36	S	S
33	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	37	S	S
34	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	35	S	S
35	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	45	S	S
36	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	32	S	S
37	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	41	S	S
38	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	36	S	S
39	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	37	S	S
40	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	39	S	S
41	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	42	S	S
42	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	40	S	S
43	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	50	S	S
44	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	38	S	S
45	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	38	S	S
46	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	37	S	S
47	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	39	S	S
48	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	41	S	S
49	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	40	S	S
50	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	46	S	S
51	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	41	S	S

52	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	42	S	S
53	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	42	S	S
54	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	38	S	S
55	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	10/nov	11/nov	43	S	S
56	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	15/nov	16/nov	41	S	S
57	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	15/nov	16/nov	39	S	S
58	Sangue	GS	3384804	3356517	64426514	7951845103	15/nov	16/nov	38	S	S
59	Exs Purulento	Mac	3384804	3376986	64426514	7951845103	15/nov	16/nov	36	S	S
60	Exs Purulento	Mac	3384804	3376986	64426514	7951845103	15/nov	16/nov	40	S	S
61	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	16/nov	17/nov	38	S	S
62	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	16/nov	17/nov	39	S	S
63	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	16/nov	17/nov	35	S	S
64	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	16/nov	17/nov	44	S	S
65	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	16/nov	17/nov	42	S	S
66	Urina	CPSE	3384804	1008898490	64426514	7951845103	16/nov	17/nov	44	S	S
67	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	17/nov	18/nov	41	S	S
68	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	17/nov	18/nov	39	S	S
69	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	17/nov	18/nov	38	S	S
70	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	17/nov	18/nov	42	S	S
71	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	17/nov	18/nov	39	S	S
72	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	18/nov	19/nov	36	S	S
73	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	18/nov	19/nov	37	S	S
74	Urina	CPSE	3384804	1008930650	64426514	7951845103	18/nov	19/nov	39	S	S
75	Sangue	GS	3384804	3365517	64426514	7951845103	18/nov	19/nov	35	S	S
76	Sangue	Mac	3384804	4333839	64426514	7951845103	18/nov	19/nov	39	S	S
77	Sangue	Mac	3384804	3376986	64426514	7951845103	18/nov	19/nov	40	S	S
78	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	45	S	S
79	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	38	S	S
80	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	37	S	S

81	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	37	S	S
82	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	38	S	S
83	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	35	S	S
84	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	36	S	S
85	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	35	S	S
86	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	39	S	S
87	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	41	S	S
88	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	40	S	S
89	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	40	S	S
90	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	43	S	S
91	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	44	S	S
92	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	38	S	S
93	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	37	S	S
94	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	40	S	S
95	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	44	S	S
96	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	39	S	S
97	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	24/nov	25/nov	30	S	S
98	Sangue	GS	3388090	3381485	64426514	7951845103	25/nov	26/nov	36	S	S
99	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	25/nov	26/nov	45	S	S
100	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	25/nov	26/nov	40	S	S
101	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	25/nov	26/nov	36	S	S
102	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	25/nov	26/nov	42	S	S
103	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	29/nov	30/nov	35	S	S
104	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	29/nov	30/nov	39	S	S
105	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	29/nov	30/nov	38	S	S
106	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	29/nov	30/nov	49	S	S
107	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	29/nov	30/nov	40	S	S
108	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	29/nov	30/nov	50	S	S
109	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	29/nov	30/nov	39	S	S
110	Urina	CPSE	3388090	1008980750	64426514	7951845103	02/dez	03/dez	39	S	S

111	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	02/dez	03/dez	40	S	S
112	Urina	CPSE	3388090	1008930650	64426514	7951845103	02/dez	03/dez	37	S	S
113	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	39	S	S
114	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	38	S	S
115	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	-	R	R
116	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	40	S	S
117	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	39	S	S
118	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	39	S	S
119	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	41	S	S
120	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	42	S	S
121	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	34	S	S
122	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	37	S	S
123	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	43	S	S
124	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	36	S	S
125	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	37	S	S
126	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	40	S	S
127	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	06/dez	07/dez	35	S	S
128	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	44	S	S
129	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	30	S	S
130	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	36	S	S
131	Urina	CPSE	3396228	1008930650	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	38	S	S
132	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	40	S	S
133	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	44	S	S
134	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	36	S	S
135	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	42	S	S
136	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	36	S	S
137	Urina	GS	3384804	3381495	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	32	S	S
138	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	39	S	S
139	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	38	S	S
140	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	40	S	S

141	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	41	S	S
142	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	41	S	S
143	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	09/dez	10/dez	39	S	S
144	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	13/dez	14/dez	44	S	S
145	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	13/dez	14/dez	42	S	S
146	Urina	CPSE	3384804	1008980750	64426514	7951845103	13/dez	14/dez	39	S	S
147	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64426514	7951845103	13/dez	14/dez	41	S	S
148	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	38	S	S
149	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	37	S	S
150	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	40	S	S
151	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	41	S	S
152	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	43	S	S
153	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	35	S	S
154	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	41	S	S
155	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	38	S	S
156	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	40	S	S
157	Urina	CPSE	3396228	1008980750	64442460	7951845103	14/dez	15/dez	41	S	S
158	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	15/dez	16/dez	37	S	S
159	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	15/dez	16/dez	36	S	S
160	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	15/dez	16/dez	36	S	S
161	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	15/dez	16/dez	41	S	S
162	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	15/dez	16/dez	40	S	S
163	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	15/dez	16/dez	35	S	S
164	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	16/dez	17/dez	36	S	S
165	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	16/dez	17/dez	38	S	S
166	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	16/dez	17/dez	40	S	S
167	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	16/dez	17/dez	38	S	S
168	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	16/dez	17/dez	39	S	S
169	Urina	CPSE	3396228	1008952030	64442460	7951845103	16/dez	17/dez	37	S	S
170	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	38	S	S

171	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	40	S	S
172	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	41	S	S
173	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	28	S	S
174	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	40	S	S
175	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	37	S	S
176	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	38	S	S
177	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	40	S	S
178	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	42	S	S
179	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	38	S	S
180	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	36	S	S
181	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	42	S	S
182	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	37	S	S
183	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	39	S	S
184	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	38	S	S
185	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	03/jan	04/jan	36	S	S
186	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	04/jan	05/jan	38	S	S
187	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	04/jan	05/jan	36	S	S
188	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	04/jan	05/jan	33	S	S
189	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	04/jan	05/jan	36	S	S
190	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	04/jan	05/jan	40	S	S
191	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	05/jan	06/jan	41	S	S
192	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	05/jan	06/jan	36	S	S
193	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	05/jan	06/jan	41	S	S
194	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	05/jan	06/jan	40	S	S
195	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	05/jan	06/jan	37	S	S
196	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	05/jan	06/jan	38	S	S
197	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	05/jan	06/jan	40	S	S
198	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	34	S	S
199	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	39	S	S
200	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	37	S	S

201	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	39	S	S
202	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	40	S	S
203	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	38	S	S
204	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	38	S	S
205	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	37	S	S
206	Urina	CPSE	3396228	1009017950	64442460	7951845103	06/jan	07/jan	37	S	S
207	Urina	CPSE	3396228	1009017950	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	40	S	S
208	Urina	CPSE	3396228	1009017950	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	-	R	R
209	Urina	CPSE	3396228	1009017950	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	31	S	S
210	Urina	CPSE	3396228	1009017950	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	37	S	S
211	Urina	CPSE	3396228	1009017950	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	38	S	S
212	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	42	S	S
213	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	41	S	S
214	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	37	S	S
215	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	39	S	S
216	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	39	S	S
217	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	38	S	S
218	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	39	S	S
219	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	40	S	S
220	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	37	S	S
221	Urina	CPSE	3396228	1008991070	64442460	7951845103	10/jan	11/jan	36	S	S
222	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	37	S	S
223	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	38	S	S
224	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	41	S	S
225	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	41	S	S
226	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	45	S	S
227	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	37	S	S
228	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	35	S	S
229	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	41	S	S
230	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	34	S	S

231	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	19	R	R
232	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	19/jan	20/jan	40	S	S
233	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	20/jan	21/jan	38	S	S
234	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	20/jan	21/jan	39	S	S
235	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	20/jan	21/jan	36	S	S
236	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	20/jan	21/jan	37	S	S
237	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	20/jan	21/jan	37	S	S
238	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	20/jan	21/jan	38	S	S
239	Urina	CPSE	3415331	1009089430	64442460	7951845103	20/jan	21/jan	35	S	S
240	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	26/jan	27/jan	45	S	S
242	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	26/jan	27/jan	42	S	S
243	Urina	CPSE	3415331	1009017950	64442460	7951845103	26/jan	27/jan	40	S	S
244	Sangue	GS	3415331	3407100	64442460	7951845103	26/jan	27/jan	40	S	S
245	Sangue	GS	3415331	3407100	64442460	7951845103	26/jan	27/jan	39	S	S
246	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	39	S	S
247	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	41	S	S
248	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	40	S	S
249	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	38	S	S
250	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	37	S	S
251	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	40	S	S
252	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	40	S	S
253	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	38	S	S
254	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	39	S	S
255	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	43	S	S
256	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	36	S	S
257	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	38	S	S
258	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951845103	27/jan	28/jan	40	S	S
259	Exs Purulento	GS	3422032	3407100	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	40	S	S
260	Sangue	GS	3422032	3407100	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	39	S	S

261	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
262	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
263	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	43	S	S
264	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	42	S	S
265	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	45	S	S
266	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	37	S	S
267	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
268	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
269	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	39	S	S
270	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	40	S	S
271	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	40	S	S
272	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
273	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
274	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	39	S	S
275	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	37	S	S
276	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
277	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	36	S	S
278	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	31/jan	01/fev	38	S	S
279	Líquido	GS	3422032	3407100	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	34	S	S
280	Sangue	GS	3422032	3407100	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	36	S	S
281	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	40	S	S
282	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	38	S	S
283	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	37	S	S
284	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	39	S	S
285	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	37	S	S
286	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	41	S	S
287	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	38	S	S
288	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	39	S	S
289	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	01/fev	02/fev	41	S	S
290	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	37	S	S

291	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	35	S	S
292	Sangue	GS	3422032	3407100	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	42	S	S
293	Sangue	GS	3422032	3407100	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	39	S	S
294	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	38	S	S
295	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	40	S	S
296	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	36	S	S
297	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	02/fev	03/fev	41	S	S
298	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	03/fev	04/fev	38	S	S
299	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	03/fev	04/fev	37	S	S
300	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	03/fev	04/fev	36	S	S
301	Urina	CPSE	3422032	1009089430	64442460	7951971203	03/fev	04/fev	38	S	S
302	Urina	CPSE	3422032	1009102150	64442460	7951971203	03/fev	04/fev	39	S	S
303	Urina	CPSE	3422032	1009102150	64442460	7951971203	03/fev	04/fev	39	S	S
304	Urina	CPSE	3422032	1009102150	64442460	7951971203	08/fev	09/fev	38	S	S
305	Urina	CPSE	3422032	1009102150	64442460	7951971203	08/fev	09/fev	41	S	S
306	Urina	CPSE	3422032	1009102150	64442460	7951971203	08/fev	09/fev	40	S	S
307	Sangue	GS	4347920	3416227	64442460	7952019203	23/fev	24/fev	42	S	S