

The Urogenital Microbiome in the Overactive Bladder

Letícia Corrêa Lopes

M
2023



The Urogenital Microbiome in the Overactive Bladder

Letícia Corrêa Lopes



MASTER IN CLINICAL ANALYSIS

The Urogenital Microbiome in the Overactive Bladder

Letícia Corrêa Lopes

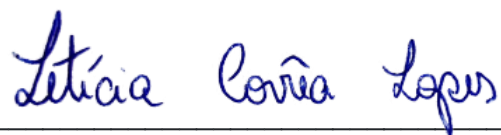
Monograph of the 2nd cycle of studies leading to the degree of
Master in Clinical Analysis

This work was supervised by Professor Dr. Filipa Grosso and co-supervised by Professor Dr.
Luísa Peixe (Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal).

June of 2023

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Letícia Corrêa Lopes



Acknowledgements

I would like to begin by expressing my gratitude to my supervisor Filipa Grosso and co-supervisor Luísa Peixe for their patience, encouragement, dedication, and guidance throughout the completion of this work. They provided me with valuable research materials and contributed to overcoming my difficulties.

I would also like to thank Professor Eugénia Pinto and Andrea Gouveia from the Academic Service at the Faculty of Pharmacy, University of Porto, for their prompt assistance and support from the start of my master's enrollment. They have always been available to address my doubts and encouraged me in the completion of my studies.

I am deeply grateful to those who have always been there for me, even from afar, and have made every effort to ensure that I invest in my education and lack nothing. Without the security and support you provide, none of this would have been possible. Thank you to my mother Lucy, my father Carlos, and my stepfather Sergio. I love you with all my heart.

I would also like to express my appreciation to the family I have built far away from my home country. Thank you for the comforting embraces, the shared celebrations, and the support. My time here would not have been as peaceful, warm, and enjoyable without you, my friends and my love. Thank you for never doubting my abilities, even when I doubted myself so many times.

To the people I love, thank you for teaching me how to navigate life guided by love, because it is this love that makes me capable of so much.

My sincere thanks to all.

Abstract

Overactive bladder (OAB) syndrome is a chronic condition that significantly impacts the lives of both men and women. The global prevalence of OAB ranges from 8% to 14%. Although the exact cause of OAB remains unknown, several factors have been associated with its development, including age, sex, lifestyle factors, and alterations in the urinary microbiome. Traditionally, it was believed that the urinary tract was sterile in healthy individuals. However, recent research has challenged this notion by revealing the presence of bacteria in the bladder and urethra, even in the absence of infection. This discovery raises questions about the potential contribution of microorganisms in the development of diseases, which had not been previously considered.

This study aims to review the evidence regarding the role of the urinary microbiome in the development of OAB syndrome, appraising the suitability of available methodologies (enhanced quantitative urine culture (EQUC) and culture independent methods), based on a comprehensive search of PubMed/MEDLINE and Google Scholar databases between 2011 and 2023.

A comprehensive analysis of 15 studies comparing the urinary microbiome composition between individuals with and without OAB symptoms revealed variations in microbial diversity and abundance, despite the occurrence of conflicting results among the studies. Nevertheless, associations between changes in microbial diversity and the severity of OAB symptoms and correlations between specific microbial genera or groups (e.g., *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Lactobacillus*) and OAB symptoms have been identified. These findings suggest that an imbalance in the urogenital microbiome may contribute to the development and progression of OAB. Nevertheless, variability in sampling techniques, study sizes, and methods used for bacterial identification, together with a yet limited number of studies, can influence the accuracy and comparability of microbiome data.

In conclusion, the characterization of the urogenital microbiome and its association with OAB symptoms is an emerging field of research. The use of advanced sequencing and culturomics techniques has provided valuable insights into the microbial composition and potential imbalances in OAB patients. However, additional research employing standardized, accurate, and detailed methodologies is necessary to fully understand the precise role of the urinary microbiome in the development of OAB and to explore its potential as a target for novel therapeutic interventions.

Keywords: Overactive bladder; urinary microbiome; 16S-amplicon sequencing; culturomics; *Lactobacillaceae*; uropathogens

Resumo

Bexiga hiperativa (BH) é uma condição crônica que afeta significativamente a vida tanto de homens quanto de mulheres. A prevalência global da BH varia de 8% a 14%. Embora a causa exata da BH ainda seja desconhecida, vários fatores têm sido associados ao seu desenvolvimento, incluindo idade, sexo, estilo de vida e alterações no microbioma urinário. Tradicionalmente, acreditava-se que o trato urinário fosse estéril em indivíduos saudáveis. No entanto, pesquisas recentes têm questionado essa noção ao revelar a presença de bactérias na bexiga e uretra, mesmo na ausência de infecção. Essa descoberta levanta questões sobre a potencial contribuição de microrganismos no desenvolvimento de doenças, o que não havia sido considerado anteriormente.

Este estudo tem como objetivo rever as evidências mais recentes sobre o papel do microbioma urinário no desenvolvimento da síndrome da BH, avaliando a adequação das metodologias disponíveis (cultura urinária quantitativa aprimorada - EQUIC e métodos independentes de cultura), tendo por base uma pesquisa dos estudos publicados entre 2011 e 2023 e disponíveis nas bases de dados PubMed/MEDLINE e Google Scholar.

A análise de 15 estudos comparando a composição do microbioma urinário entre indivíduos com e sem sintomas de BH revelou variações na diversidade e abundância microbiana, apesar da ocorrência de resultados discordantes entre alguns estudos. No entanto, foi possível associar alterações na diversidade microbiana com a gravidade dos sintomas de BH e correlacionar a presença de gêneros ou grupos bacterianos específicos (por exemplo, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Lactobacillus*) com sintomas de BH. Estes resultados sugerem que um desequilíbrio no microbioma urogenital pode contribuir para o desenvolvimento e progressão da BH. No entanto, a variabilidade nas técnicas de amostragem, diferentes populações estudadas e métodos usados para identificação bacteriana, juntamente com um número ainda limitado de estudos, dificultam a comparabilidade dos dados do microbioma.

Em conclusão, a caracterização do microbioma urogenital e a sua associação com os sintomas de BH é uma área crucial de estudo. O uso de técnicas avançadas de sequenciação e culturômica tem fornecido informações valiosas sobre a composição microbiana e desequilíbrios potenciais em doentes com BH. No entanto, estudos adicionais que utilizem metodologias padronizadas, precisas e detalhadas são necessários para compreender de forma mais precisa o papel do microbioma urinário no desenvolvimento da BH e explorar seu potencial como alvo para novas intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Bexiga hiperativa; microbioma urinário; sequenciação rRNA 16S; culturômica; *Lactobacillaceae*; uropatogênicos

Table of contents

1 - Introduction.....	1
2 - Evidence acquisition.....	4
3 - Pathophysiology of Overactive Bladder.....	5
4 - Urinary microbiome.....	9
4.1 - Methods used for urine collection.....	15
4.2 - Methods for urine processing and analysis.....	16
4.3 - The urinary microbiome in the Overactive Bladder.....	19
4.4 - OAB symptoms and urogenital microbiome.....	28
4.5 - Limitations for understanding the microbiome's role in OAB.....	30
4.6 - Future Directions.....	32
5 - Conclusions.....	34
6 - References.....	36
7 - Appendix.....	40

List of figures

Figure 1 - Primary symptoms of OAB and UTI overlapping.....	3
Figure 2 - Illustration of the microbiota, metagenome and microbiome.....	9
Figure 3 - Collection methods for urine samples.....	15

List of Tables

Table 1 - Summary of studies on urinary microbiome in asymptomatic donors and with bladder diseases and main conclusions.....	13
Table 2 - Summary of studies on urinary microbiome associated with OAB or OAB symptoms.....	24

List of Abbreviations

AMP, antimicrobial peptides
BOO, bladder outlet obstruction
BV, bacterial vaginosis
DO, detrusor overactivity
EQUC, enhanced quantitative urine culture
FUM, female urogenital microbiome
HMP, human microbiome project
IPSS, international prostate symptom score
LUT, lower urinary tract
LUTS, lower urinary tract symptoms
MSU, midstream clean-catch urine
NGF, nerve growth factor
NGS, next-generation sequencing
OAB, overactive bladder
OABSS, overactive bladder symptom score
OABq, overactive bladder questionnaire
rRNA, ribosomal RNA
SPA, suprapubic aspiration
SUC, standard urine culture
TUC, transurethral catheter
UGT, urogenital tract
UUI, urgency urinary incontinence
UTI, urinary tract infection
WGS, whole-genome sequencing

1 - Introduction

Overactive bladder (OAB) syndrome is a chronic condition that affects both women and men, with a global prevalence ranging 8-14% according to different studied populations and depending on sex and age [1]. Considering the age, studies show that prevalence rises to 30.9% in those older than 65 years old, with a tendency to increase since the world is facing a shift in longevity and a rising proportion of older people [2,3]. OAB was defined by The International Continence Society (ICS) in 2014 as “a syndrome characterized by symptoms of urgency, with or without urgency incontinence, usually with increased daytime frequency and nocturia (increased nighttime urination). The term OAB can only be used if there is no proven infection or other obvious pathology” [4]. As said, it is a syndrome characterized by unstable bladder contractions that results in urinary urgency (a sudden, strong desire to urinate), with or without urinary incontinence (sudden and involuntary loss of urine), increased daytime frequency (urinating more than 8 times in 24 hours) and nocturia (awakening to urinate) [1,5].

By definition, it is a disease with an idiopathic cause (unknown cause) which is diagnosed in the absence of other organic disease, such as cancer, neurological or structural abnormalities, or urinary tract infection (UTI). The primary symptoms of OAB and UTI can overlap. Urinary frequency, urinary urgency, and nocturia symptoms are associated with both OAB and acute UTI but clinically, OAB patients are differentiated by the absence of bacteriuria and/or a negative dip-stick test, that must be present in UTI [6] **(Figure 1)**. These symptoms can lead to physical and psychological distress, embarrassment, low self-esteem, and disturbed sleep. Delaying treatment can significantly reduce quality of life [6,7,8].

The symptoms are typically associated with detrusor overactivity and their severity was shown to have a direct correlation with the patients' age. Furthermore, it can affect children and young individuals, both men and women, where urgency incontinence is a more common symptom in women, and urgency and frequency more common in men [9,10].

Although the original cause remains unknown, it is proven to believe that obesity, caffeine intake, constipation, poor mobility, alcohol can be modifiable risk factors, followed by non-modifiable risks, such as metabolic syndrome, postmenopausal, chronic pelvic pain, diabetes, sex (female) and age [10,11]. Another factor for urinary urgency in OAB has shown to be smoking. Smoking could be related to an anti-oestrogenic hormonal effect on the bladder and urethra and a nicotine induced phasic contraction of the detrusor muscle [12]. The postmenopausal factor has been associated with frequency symptom and can be explained because estrogen has an important role in the urogenital tract

(UGT) through estrogen receptors in urethra, bladder and pelvic floor, where deficiency related to lower levels after menopause, causes atrophic changes. This reveals that estrogen treatment can have a positive influence on OAB symptoms in women [13,14]. Also, in the nonelderly, estrogen and progesterone appear to influence bladder contractions and voiding frequency, along with genetic, psychosocial and biological factors, which may be a reason why there are more studies and reports on female patients [15].

Current treatment options for OAB encompass behavioral training, medication, detrusor injection, and nerve stimulation of sacral or tibial nerves. However, the effectiveness of these treatments is limited in providing a complete cure. Conventional therapeutic procedures for OAB are mainly directed at relieving symptoms rather than reversing pathophysiological effects [16]. A subtype of anticholinergics known as antimuscarinics are commonly employed in OAB management as first-line drugs, despite their many adverse effects. They are followed by beta-3 adrenergic receptor agonists, whose efficacy varies significantly among patients, with no guaranteed positive outcomes. While the diagnosis of OAB excludes the presence of UTI, there is a growing interest in investigating the potential role of urine microbiota composition as a biomarker for OAB and as a potential target for treatment option [17,18].

After the completion of the Human Microbiome Project (HMP), created in 2008 by the National Institutes of Health, many studies identifying and cataloging the microbiome in physiological and pathological states, along with investigating its role in human health and maintaining homeostasis in various sites such as gastrointestinal tract, nasal and oral cavities, skin, and vagina, have been made [19,20]. For many years, the urinary tract was not fully explored because traditionally it was considered to be a sterile environment (except for urethra). However, with the development of DNA-based analysis such as 16S rRNA gene sequence or shotgun metagenomics and more detailed culture-dependent methods, such as enhanced quantitative urine culture (EQUC), slow or fastidious aerobic and anaerobic growing bacteria were detected in urines of asymptomatic people, indicating that they were part of a unique commensal flora colonizing the urinary tract. [19,20,21]

The term “urinary tract”, in this review, refers to the organ system that includes the kidney, ureter, bladder and urethra, namely involved in the production, transport, storage, and excretion of urine. Since it is still unclear the existence of a “core” microbiota either in males or females, as there is also ongoing researches of how to characterize the human urinary microbiome, or urobiome, and results that demonstrate that there is a frequent exchange of microbial communities between body sites within the same individual [22,23], it is important to consider that the structure of the urinary microbiome might also be

influenced by a larger system called UGT, that consists in the urinary tract and anatomic sites and organs such as the vagina, cervix, periurethral skin, penis, pubic skin surfaces, and perineal area [24].

The proper role of bacteria in the urinary tract is still under study, but findings such as the presence of bacteria in a urine specimen from a patient without signs or symptoms of a UTI, influence in urgency urinary incontinence (UUI) pathogenesis and low-count bacteria in urine that has been associated with symptoms of OAB, showing that alterations in the urinary microbiome can influence the human organism balance in various ways that deserve further investigations [25].

This review aims to provide a comprehensive overview of OAB syndrome, focusing on the potential role of the urinary microbiome in OAB pathogenesis and its implications for diagnosis and treatment. The review will also discuss the limitations and challenges associated with studying the urinary microbiome, including variations in sampling techniques, study size, and microbial identification methods. By summarizing the available evidence and highlighting research gaps, this review seeks to contribute to a better understanding of the complex relationship between the urinary microbiome and OAB, and to guide future research efforts in this field.

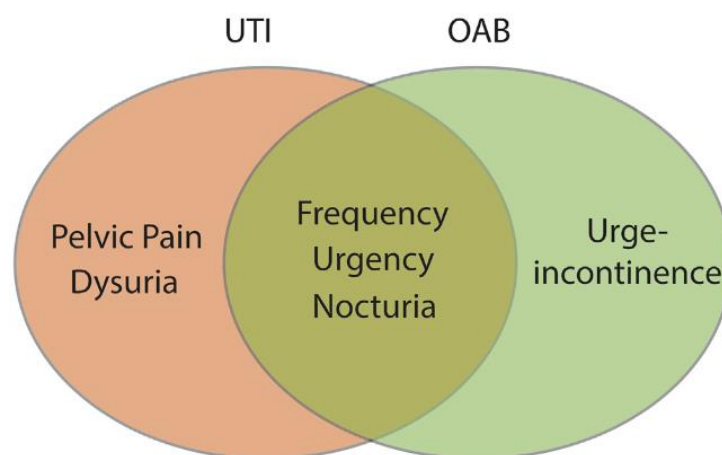


Figure 1- Primary symptoms of OAB and UTI overlapping. Source: Mansfield et al. - 2022 - Urinary Tract Infection in Overactive Bladder: An Update on Pathophysiological Mechanisms [6]

2- Evidence acquisition

A search on PubMed/MEDLINE and Google Scholar was conducted using the following terms/keywords: Microbiome OR Microbiota OR Microbes OR Urobiome OR Urinary/Urogenital microbiome OR Urinary/Urogenital microbiota AND (urinary tract symptom OR overactive bladder OR bladder disease). The range of search was placed between 2011 and 2023, with preference for more recent studies, and articles with no fulltext available or those not written in English were excluded. All retrieved papers were first reviewed by title and abstract, and papers with experimental research were given preference over reviews. Additional manuscripts, such as those referenced by reviews, were further included.

3- Pathophysiology of Overactive Bladder

The etiology of OAB remains poorly understood and continues to be a subject of study, primarily due to its varying manifestations among patients. Accurate assessment of OAB necessitates a comprehensive approach, including a detailed medical history, quantification of local symptoms, and examination of the urogenital system [10]. There are many theories of what could cause the syndrome, and they are usually related to the term “detrusor overactivity” (DO). The detrusor (smooth bladder muscle) is strongly innervated, and the function of the bladder is guaranteed by a complex mechanism between the central and peripheral nervous system [9]. The overactivity suggests that the sensory mechanism of the bladder is affected, leading to the creation of an urgency in emptying the bladder at much smaller quantities than under normal conditions and also altering voiding reflex [9,26].

The micturition cycle is mostly comprised of the storage phase, which is governed by the sympathetic nerve that contributes to bladder relaxation with urethral smooth muscle and urethral and pelvic floor striated muscles keeping the outflow closed, followed by the absence of the spinal parasympathetic activity and bladder contractions. The sympathetic nerve and the pudendal nerve are also important for contraction of the external sphincter during the storage phase. During voiding, the decreased sympathetic activity contributes to bladder outflow with sphincter relaxation, and increased parasympathetic input, lead to detrusor contractions and emptying of the bladder [1,26].

In healthy situations, many receptors and neurotransmitters are involved during micturition, such as acetylcholine (ACh) released from parasympathetic nerves, norepinephrine, dopamine, serotonin, excitatory and inhibitory amino acids, adenosine triphosphate (ATP), nitric oxide and neuropeptides in the spinal cord and muscarinic receptors (M3) and beta adrenergic receptors (B3) in the detrusor [26].

Multiple theories have been proposed to elucidate the underlying mechanism of involuntary detrusor contractions in OAB. Among these theories, the two main pathophysiological explanations propose either a neurogenic or a myogenic origin [1,27]. The first one focuses on both central and peripheral innervation disturbances, where OAB may result from a lack of central nervous inhibition of voiding as a result of default in neural plasticity, resulting in primitive voiding reflexes that trigger detrusor overactivity. Additionally, possible ischemia that can irreversibly damage nerves and the apoptosis of smooth muscle cells that can lead to impaired contractility [15,26,27]. According to myogenic theory, the DO may result from histologic changes from the smooth bladder muscle that can lead to abnormal electrical cells excitation, enabling electrical impulses to

be propagated along a large number of cells and resulting on physiological micromotions synchronized into involuntary detrusor contractions [1,26,28].

The fact that the presence of DO affects only 50% of female patients with OAB, encouraged further research that led to the discussion of other theories to identify possible factors involved [28]. These theories include: the urotheliogenic theory where the urgency results from a urothelium/suburothelium problem in sensory mechanisms [9,15,26,28]; the supraspinal theory that relates urgency with the deterioration in the white matter of the brain and brainstem that can happen with the agedness [28]; and the detrusor underactivity theory, caused by urothelial dysfunction or histologic changes in the DO associated with reduced functional bladder capacity along with urinary retention and consequently recurrent urinary tract infections can cause urgency [28]. Recent findings provide growing support for the notion that increased afferent nerve signaling, stemming from dysfunction in the urothelial/suburothelial region, plays a significant role in unrestricted detrusor contractions and serves as the underlying cause of OAB. As a result, OAB can now be characterized as a sensory-symptom complex rather than solely attributed to detrusor activity [16].

Other causal factors such as bladder outlet obstruction (BOO), metabolic syndrome, and inflammation have also been considered as significant aspects influencing OAB. OAB induced by BOO has been attributed to change in NGF, TREK1, K⁺ channel, muscarinic and purinergic receptors. The Nerve Growth Factor (NGF) is a secretory protein fundamental in development and maintenance of the peripheral nervous system. TREK1 and K⁺ channel help to regulate electrical activity in nerve cells, muscarinic and purinergic receptors are involved in regulation of bladder contraction [29]. The metabolic syndrome involves risk factors of cardiovascular disease, diabetes, insulin resistance, central obesity, dyslipidemia and hypertension. For example, Rohrmann et al. conducted an epidemiological study revealing that individuals with metabolic syndrome, particularly men, exhibited a higher likelihood of experiencing nocturia, incomplete bladder emptying, a weak stream, and hesitancy [30]. In cases of inflammation, prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesized in bladder muscle and mucosa, can affect the normal micturition reflex, generating OAB symptoms [31]. Also, pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, and CXCL-10 have also been linked to worsening OAB symptoms [6,32].

The identification of local mechanisms involved in OAB has sparked considerable interest in developing future pharmacological agents specifically targeting these mechanisms. Considering that the syndrome can arise from the sensitization of afferent nerves combined with abnormal activity in the urothelium, understanding and targeting these physiological implications hold potential for the development of effective treatments for OAB. Once non-pharmacological interventions have been attempted, such as patient

education and motivating lifestyle modifications (such as weight loss, abstaining from coffee and alcohol, and quitting smoking), along with pelvic muscle training to enhance urethral stability and minimize instances of urgency and incontinence, anticholinergic medications such as oxybutynin and solifenacin, are commonly prescribed as the first-line drug treatment for OAB, followed by β -3 adrenergic receptor agonists such as mirabegron [1,9,18]. These medications function by reducing contractions of the detrusor muscle and increasing bladder capacity, resulting in a reduction of incontinence, frequency, and urgency of urination. However, studies have indicated that only a small number of patients treated with antimuscarinic agents experience long-lasting improvement especially due to the occurrence of numerous side effects [6,9]. In cases where symptoms are resistant or unresponsive to standard treatment approaches, it is called refractory OAB, and more invasive measures can be taken such as 3 distinct types of neuromodulation therapy: intravesical botulinum toxin A injections, sacral nerve stimulation and peripheral tibial nerve stimulation through the use of electrodes. If suitable for the individual, or in more severe cases, surgery may be considered a treatment option when other conservative methods have been unsuccessful [10,18].

Instead of a single form of OAB, there are several OAB phenotypes, each with its own underlying mechanisms and pathophysiological cofactors, where the use of biomarkers to phenotyping and clustering patients with similar characteristics can be very useful. The OAB biomarkers that have been researched in the last years include urinary neurotrophins such as NGF and BDNF (brain-derived neurotrophic factor) produced in the urothelium and smooth muscles; urinary ATP released from the urothelium; genomics such as urinary β 3-adrenoceptor (β 3-AR) and miRNA (micro ribonucleic acid) and more recently PGE₂, antimicrobial peptides (AMPs) and the urinary microbiota [7,33].

Some new gene therapy approaches were examined to determine their effectiveness in managing and improving symptoms of OAB. Among these approaches, the utilization of ion channel gene therapy is an option for controlling detrusor overactivity and bladder hyperactivity since this channel type plays a crucial role in modulating the tone of detrusor smooth muscle cells by functionally counteracting the transmembrane calcium flux [34]. Other research investigations have directed their attention towards the manipulation of the NGF encoding gene due to its role as a potential mediator of symptoms related to OAB. Primarily, the overexpression of NGF in the bladder has been implicated in contributing to these symptoms, and there have been explored methods to downregulate NGF, either through direct antibody intervention or indirect inhibition of NGF mRNA translation. In a study by Kashyap et al. in 2013, they developed a novel intravesical therapy for OAB that targets the intracellular synthesis of NGF specifically in the urothelium. The findings of the study demonstrated that the increased content of NGF

in the bladder, induced by acetic acid irritation, could be effectively blocked through this therapeutic approach [35].

It is known that microorganisms play an important role in maintaining balance in the human body, having protective functions against pathogens, and contributing to the immune system but, also changes in microbiome were associated with several diseases such as obesity, inflammatory bowel disease, Crohn disease and others [36]. Recent findings of the existence of a human urinary microbiome, following advances in culture methods enabling to expand culture conditions that have allowed researchers to detect bacteria at lower levels concentrations, has made it possible to question and investigate if alterations in the urogenital microbiome may have an effect on urinary tract disorders and also play a role in the pathogenesis of OAB [19,27,28].

4 - Urinary microbiome

The urinary tract was long believed to be a sterile environment in healthy individuals. This belief was based on the fact that urine, which is continuously produced by the kidneys and transported through the urinary tract, seemed to be free of bacteria and other microorganisms. In addition, the urinary tract has several natural defense mechanisms that help prevent infections, such as the flushing action of urine flow and the presence of antibacterial substances in urine. However, research has shown that the urinary tract is not completely sterile, and that there are variable levels of bacteria present in the bladder and urethra even in healthy individuals [38,39].

To better understand the microbial world and its interactions with hosts and environments, the terms microbiota, microbiome, and metagenome are widely used. The term microbiota refers to the microbes that collectively compose and inhabit a specific ecosystem. The definition of microbiome relates to the pool of all genomes from different microorganisms including commensal, symbiotic and pathogenic, that coexist in our organism in a balanced way. The term is a reference of the habitat as a whole, encompassing host and microorganism genomes and environmental conditions. The metagenome refers to the collective genetic material or DNA sequences derived from a microbial community within a particular environment [20,37,38] (**Figure 2**).

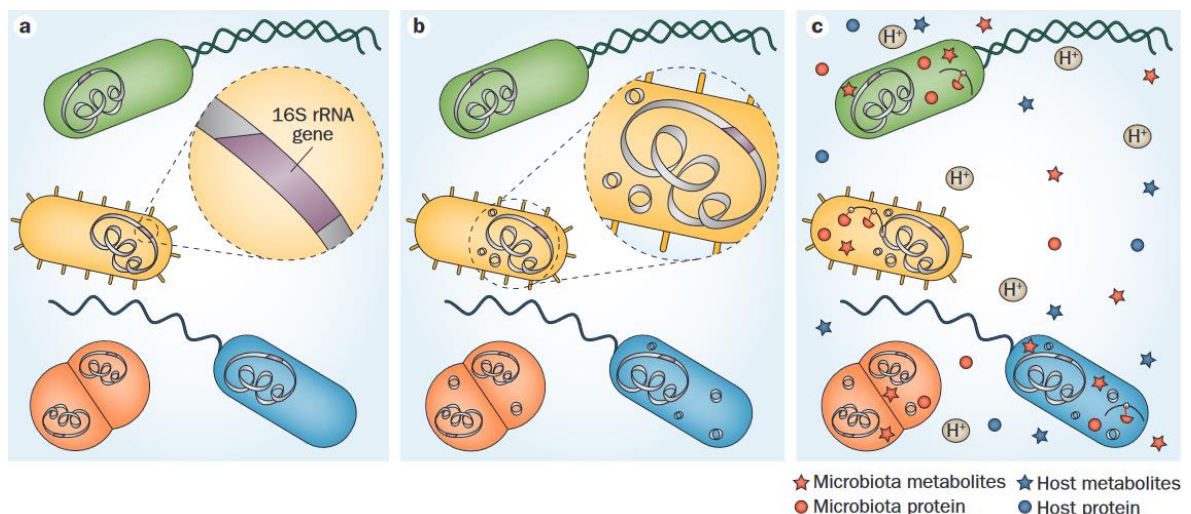


Figure 2 - Illustration of the microbiota, metagenome and microbiome. **a)**Microbiota: to identify the microorganisms that inhabit a particular ecological niche it is possible to use 16S rRNA gene sequencing that can characterize taxonomic diversity present in microbial communities. **b)**Metagenome: the genes and genomes of the microbiota, including plasmids, indicate the genetic potential of the microbiota and not the actual activity of the population. **c)**Microbiome: the genes and genomes of the microbiota, as well as the products of the microbiota and the host environment.

Source: Whiteside et al. - 2015 - The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. [38]

Various methods are commonly employed to identify and characterize bacteria within the microbiota. Whole-Genome Sequencing (WGS) allows for the sequencing of an organism's entire genome, providing comprehensive genetic information for species and

strain identification, as well as the detection of virulence factors and antibiotic resistance genes. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) utilizes bacterial proteins to generate distinct mass spectral patterns for rapid and reliable identification. Phenotypic characterization examines growth patterns, colony morphology, biochemical reactions, and metabolic activities. Additionally, sequencing the 16S ribosomal RNA gene, which is highly conserved among bacteria, can be achieved through PCR amplification followed by Sanger Sequencing or by Next-Generation Sequencing (NGS), utilizing reference databases like the Ribosomal Database Project (RDP) and the NCBI Bacterial 16S Ribosomal RNA RefSeq Targeted Loci Project (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/33175>), which are public repositories [40,41].

The microbiological culture of urine is conventionally used in clinical practice to isolate and identify pathogens (usually aerobic and fast-growing organisms) involved in the development of UTIs and to help clinicians choose what antibiotic treatment will work best, considering their susceptibility test [22,38]. The standardized methods for urine culture used in clinical routine were established in 1957 [42]. Although they have been through technological advances over time, they still do not consider the existence of a vast and complex bacterial profile now known to inhabit the urinary tract, with variations both in species and in abundance of bacteria detected, in each individual, which reflects the difficulty in establishing a single microbial community that could characterize the human urinary microbiome [23,27,43,44]. A study utilizing culturomics and gene sequencing methods to characterize urinary microbiome profiles of 20 healthy females had only 22% of bacterial species detected by both methodologies, showing that these approaches may be used complementary in order to obtain a clearer description of the urinary microbiome [45]. The urobiome function is still unclear and lacks further investigation but based on known functions of bacteria on mucosal surfaces such as the intestine [37,46] or the vagina [47], there are hypothesis that some microbial species (possible commensals) could stimulate a protective urinary mucosal response and that their presence is a sign of health rather than dysfunction [22,23].

It is important to consider the differences found in the urinary microbiome between men and women, and also changes associated with age. In general, women tend to have a more diverse urinary microbiome than men, which may be due to anatomical differences and hormonal fluctuations [48,49]. Also, women tend to have a greater abundance of species from the Lactobacillaceae family, which are known for their ability to produce lactic acid and maintain a low pH environment in the urinary tract. This is thought to provide protection against uropathogenic bacteria and reduce the risk of UTIs. But there appears to be a difference at species level, where *Lactobacillus gasseri* was detected more frequently in female patients with UUI and *Lactobacillus crispatus* appeared mostly

in healthy controls [27,50]. Emerging evidence indicates that *Lactobacillus iners* is considered a transitional species that colonizes the vaginal environment to promote health, but following disruptions in this environment, it can provide comparatively less protection against vaginal dysbiosis and potentially leads to the development of bacterial vaginosis and other diseases [51,52]. Strains of this bacterium exhibit an intriguing characteristic in their genome as they encode inerolysin, a cytotoxin uncommon for *Lactobacilli*. It is a pore-forming toxin that shares a relationship with vaginolysin produced by *Gardnerella vaginalis* [53].

Recent studies aiming to better understand the female urogenital microbiome (FUM) made important discoveries at the species level. Perovic et al. using a combination of extended culturomics and long read-sequencing of the 16S rRNA to analyze voided urine of 20 healthy women, detected the *Lactobacillus* genus in all samples, with an abundance of *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners* and *Lactobacillus mulieris*. Other species such as *Streptococcus agalactiae* and *Gardnerella vaginalis* also appeared in abundance. They were also able to identify the fastidious species *Fingoldia magna* in low-abundance, but prevalent among several samples [45]. Another similar study by Ksiezarek and Perovic et al. investigating the FUM overtime (within 2.5-year), was able to associate the *Fingoldia magna* and *Streptococcus anginosus* species with the smoking status of the participants. In congruence with mentioned research, they also found *Lactobacillus crispatus* to be significantly present in the composition of the FUM of these healthy women overtime [54]. Regarding opportunistic uropathogens, Perovic et al. also found for the first time *Fannyhessea vaginae* (a bacteria associated with bacterial vaginosis) in the FUM of asymptomatic women. Other species usually associated with urogenital diseases such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were also found, meaning that the asymptomatic urinary microbiome might be colonized by opportunistic uropathogens [54]. Specifically exploring the population diversity and antimicrobial resistance of *E. coli* of voided urine of 10 asymptomatic women, another study by Ksiezarek et al. was able to demonstrate that *E. coli* strains commonly involved in UTI, along with extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains were detected in the healthy female urogenital microbiome. This data is important to evaluate if urine and vagina can act as reservoirs for bacteria, that can potentially lead to the persistence and/or development of UTIs [55].

The main genera found in the male urinary microbiome are typically *Corynebacterium* [49] followed by *Staphylococcus* and *Streptococcus*, but many studies find heterogeneous results also due to different sampling and processing methods [7]. While characterizing the urogenital microbiome of a big cohort of middle-aged and elderly healthy Individuals, using 16S rRNA gene sequencing on midstream urine specimens, Qin

and colleagues discovered a disparity in the UGT microbiome between genders. *Prevotella*, differently than most studies, was the most dominant genus in both genders but significantly more prevalent in female samples, and was followed by an abundance of *Lactobacillus*, and *Anaerococcus*. while the male samples exhibited a more abundant proportion of *Streptococcus*, *Veillonella*, *Ezakiella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, and *Acinetobacter*. Their findings contribute to the belief that gender and certain age periods may have their own representative genus profile [56].

Regarding age-related aspects of the urinary microbiome, there may be changes in the composition and diversity of the microbiota found. In general, older adults tend to have a less diverse urinary microbiome than younger adults, which may be due to changes in hormonal levels, immune function, or other factors. Additionally, older adults may be more likely to have dysbiotic urinary microbiomes, which can increase the risk of UTIs and other urinary tract disorders [57]. In a study by Lewis et al., in the male and female group over 70 years of age, the bacteria count identified was lower than the younger age groups. Six common bacterial genera found on female urine samples appeared to have higher numbers in the age group between 20 and 49 years, than the group over 70 years, suggesting that the presence of these bacteria may persist throughout one's life, but their abundance appears to vary with age [48]. Another study found that richness and diversity of the microbiota were slightly lower in the elderly group compared to the non-elderly group, and generally decreasing with age. Furthermore, an increase in the number of UTI events and asymptomatic bacteriuria was also observed in the elderly group, highlighting a potential association between lower bacterial richness and diversity in older women and UTIs [57]. The studies mentioned in this chapter are more elucidated in **Table 1**.

The urogenital and urinary microbiome have the remarkable ability to maintain a harmonious relationship by hosting non-pathogenic bacteria. However, this also means that the female urogenital microbiome can act as a reservoir of potential uropathogens such as *Escherichia coli*, notorious for their role in causing UTIs. To gain a comprehensive understanding of the urinary microbiome and its influence on health, further research is necessary. This includes investigating the factors that shape the urinary microbiome and exploring the concept of a "core" bladder microbiome, which has indicators that may differ between male and female urinary tracts. Such investigations can provide valuable insights into the dysbiosis of the urinary microbiome and the potential threats it poses [48].

Table 1 - Summary of studies on urinary microbiome in asymptomatic donors and with bladder diseases and main conclusions

Population-based Study Design	Identification of OAB symptoms	Sample collection method	Methodology used	Main findings	Reference
8 healthy women	NA	Clean-catch midstream urine	Sequencing V–V2 and V6 regions of 16S rRNA gene	- Healthy female urine contains diverse bacterial 16S rDNA sequences, including bacteria associated with urogenital issues. - <i>Lactobacillus</i>, <i>Prevotella</i>, and <i>Gardnerella</i> were commonly found, but not present in all samples, suggesting a lack of a consistent microbial community for female urine. - Significant variation between individuals was observed, and a universal microbial pattern was not identified.	Siddiqui <i>et al</i> , 2011 [39]
26 healthy controls; 27 healthy subjects at risk for asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder	NA	Transurethral catheter Clean-catch midstream urine	16S rDNA sequences were generated by amplifying the V1-V3 region of 16S rRNA gene	- Uncultivated bacteria are found in the urine of healthy individuals. - <i>Corynebacterium</i> is more abundant in the urine of healthy men compared to women. - Healthy women have higher levels of <i>Lactobacillus</i>. - <i>Corynebacterium</i> may play a role in urinary health, as it is more prevalent in healthy men compared to those with neuropathic bladder, with the lowest abundance in voided samples. - The urinary microbiome of catheterized individuals with neuropathic bladder is inherently different from that of healthy controls, even without any illness present.	Fouts <i>et al</i> , 2012 [49]
6 asymptomatic men (ages 39-83); 10 asymptomatic women (ages 26-90)	NA	Clean-catch midstream urine	Sequencing V1-V3 region of 16S rRNA gene	- Females show higher bacterial genus diversity than males in the analysis. - Variation in abundance between age groups suggests the existence of a potential "core" urinary microbiome. - <i>Jonquetella</i>, <i>Parvimonas</i>, <i>Proteiniphilum</i>, and <i>Saccharofermentans</i> genera were exclusively found in the 70+ age group. - The 70+ female age group exhibited approximately 75% fewer bacteria compared to the 20-49 age group, and a similar decrease was observed in the male group.	Lewis <i>et al</i> , 2013 [48]
60 patients, 63% male (ages 30-79); Samples were obtained prior to renal transplantation and at 1 and 6 months after transplantation	NA	Urine samples, oral swabs, rectal swabs and blood	Sequencing V1-V3 regions of 16S rRNA gene	- Dominant bacteria in urine samples included <i>Lactobacillus</i>, <i>Enterococcus</i>, <i>Bifidobacteriaceae</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Streptococcus</i>, and <i>Corynebacterineae</i>. - Female samples exhibited a higher presence of microbiota-associated 16S rRNA results compared to males. - <i>Anaeroglobus</i>, <i>Facklamia</i>, <i>Clostridiales</i> (unknown members), <i>Prevotella</i>, and <i>Porphyromonadaceae</i> (unknown members) were more prevalent in female samples, while <i>Citrobacter</i> was exclusively associated with male samples. - None of the typical vaginal <i>Lactobacillus</i> species were exclusively found in female patient urine samples, ruling out contamination.	Fricke <i>et al</i> , 2014 [23]
50 elderly women; 50 non-elderly women	NA	Clean-catch midstream urine	Sequencing V3-V4 region of 16S rRNA gene	- Elderly individuals had significantly lower abundance of <i>Lactobacillus</i> compared to non-elderly individuals. - <i>Peptococcus</i> abundance increased with age in the elderly, while <i>Bifidobacteria</i> abundance decreased. - In the elderly, higher levels of <i>Lactobacillus</i> (including <i>Lactobacillus iners</i>) were linked to diabetes, while lower levels of <i>Peptoniphilus</i> and <i>Dialister</i> were associated with asymptomatic bacteriuria.	Liu <i>et al</i> , 2017 [57]
42 female patients with bacterial vaginosis; 31 healthy men; 49 healthy women	NA	Clean-catch midstream urine	Sequencing V1-V2 regions of 16S rRNA gene	- Eight community types were identified in healthy individuals, with <i>Lactobacillus crispatus</i> found exclusively in healthy women. - Metronidazole treatment for bacterial vaginosis in women reduced diversity and abundance of <i>Gardnerella vaginalis</i>, <i>Atopobium vaginae</i>, and <i>Sneathia amnii</i>, while increasing levels of <i>Lactobacillus iners</i> compared to healthy women. - Some bacteria associated with vaginosis, such as <i>Parvimonas amnii</i>, <i>Slackia amnii</i>, <i>Gardnerella vaginalis</i>, and <i>Atopobium vaginae</i>, were not affected by the antibiotic, suggesting their presence in urine rather than originating from the vagina. - The high abundance of bacteria related to bacterial vaginosis in urine suggests that urine may serve as a reservoir of pathogens and contribute to recurrence.	Gottschick <i>et al</i> , 2017 [50]

Table 1 - Summary of studies on urinary microbiome in asymptomatic donors and with bladder diseases and main conclusions

Population-based Study Design	Identification of OAB symptoms	Sample collection method	Methodology used	Main findings	Reference
1,172 healthy men and women (ages 45-86)	NA	Clean-catch midstream urine	16S rRNA gene sequencing	- The core microbiota consisted of <i>Prevotella</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Gardnerella</i>, <i>Escherichia-Shigella</i>, and <i>Veillonella</i> genera. - Gender-specific differences in the composition and diversity of the genitourinary microbiome were observed, which could vary with age. - Female samples had higher abundance of <i>Prevotella</i>, <i>Lactobacillus</i>, and <i>Anaerococcus</i>, while male samples showed higher proportions of <i>Streptococcus</i>, <i>Veillonella</i>, <i>Ezakiella</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Corynebacterium</i>, and <i>Acinetobacter</i>. - <i>Lactobacillus</i>, <i>Acinetobacter</i>, and <i>Gardnerella</i> decreased in abundance after the age of 55 in both male and female samples.	Qin <i>et al</i> , 2021 [56]
20 healthy women (ages 24-38)	NA	Clean-catch midstream urine	Extended culturomics followed by MALDI-TOF, and/or sequencing V1 to V8 regions of 16S rRNA gene	- Different techniques had varying abilities to characterize urinary microbiome profiles, with only 22% of bacterial species detected by both methods. - The most common community structure consisted of <i>Lactobacillus</i> along with <i>Staphylococcus</i>, <i>Corynebacterium</i>, <i>Streptococcus</i>, and <i>Cutibacterium</i>. - Some species, such as <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Actinomyces urogenitalis</i>, were detected in low-read counts by sequencing and also identified by extended culturomics. - The genus <i>Lactobacillus</i> was present in all samples, but no single species was identified in all. - A community structure dominated by <i>Fannyhessea vaginae</i>, associated with bacterial vaginosis, was identified for the first time, indicating that opportunistic uropathogens may colonize the asymptomatic urinary microbiome. - The study revealed previously unreported high diversity of species belonging to <i>Corynebacterium</i>, <i>Lactobacillus</i>, and <i>Limosilactobacillus</i> in the characterization of the healthy female urinary microbiome.	Perovic <i>et al</i> , 2022 [45]

4.1 - Methods used for urine collection

An important aspect of assessing the urinary microbiome is the sampling technique used. Three commonly employed sampling techniques for collecting urine samples, suitable for determining the urinary microbiota based on the desired scientific outcome, are midstream clean-catch urine (MSU), urine collection through a transurethral catheter (TUC), and suprapubic aspiration (SPA) [24,58]. None of the methods have proven to be ideal since it is important to consider that they can introduce perturbations to local microbial communities and/or result in contamination of sequential sampling sites [24] **(Figure 3)**.

The MSU is the least invasive method and can be used in studies with any kind of donor. While MSU sampling method can be susceptible to various sources of contamination, particularly in relation to patient gender, such as vaginal, skin, and perineal contribution if the periurethral area is not adequately cleansed before urine collection, this technique remains effective for studying the urinary tract microbiota. This is because the material is obtained after it has passed through the entire lower urinary tract [19,24,36]. The TUC can provide a sample of urine directly from the bladder, and a more specific specimen of the urinary tract microbiota, but the insertion of the transurethral catheter can

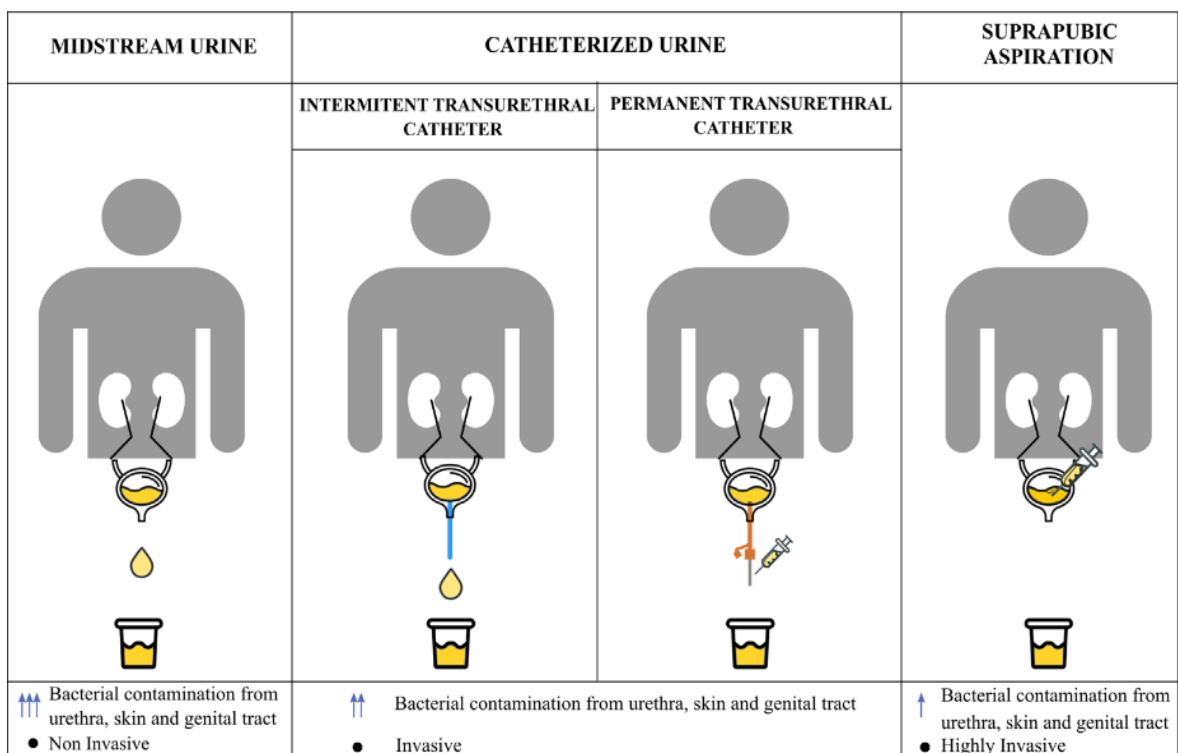


Figure 3 - Collection methods for urine samples.

Source: Perez-Carrasco et al. - 2021 - Urinary Microbiome: Yin and Yang of the Urinary Tract [36]

also sample urethral microbiota. The method is more invasive and depends on capable personnel for its collection, such as the SPA technique. For this, the bladder is accessed

via insertion of a needle through the skin of the suprapubic area, just above the pubic bone, and urine is collected directly from the bladder. It is the most invasive method and not easily accepted by all patients, especially the elderly [24,58]. In a study by Wolfe et al., urine sample methods were compared, and SPA appeared to be the best method to minimize vulvovaginal and urethral contamination in the purpose of studying the bladder microbiome, although TUC can produce similar results [22,24,44]. It is important to determine what is the goal of a study, and evaluate advantages and disadvantages of sampling techniques, but, for the purpose of this study, all three methods will be considered, with particular emphasis on MSU due to its potential for a wider use and a more comprehensive characterization of the human urogenital microbiome.

4.2 - Methods for urine processing and analysis

Advancements in methods for urine processing and analysis have significantly contributed to our understanding of the urinary microbiome through the identification of bacteria within this complex ecosystem. Two primary approaches have emerged: culture-based methods and sequence-based methods. Culture-based methods include the standard urine culture (SUC) and EQUIC, which allow isolating and growing bacteria in the laboratory setting. However, with the evolution of technology, sequence-based methods have gained prominence, especially with the use of 16S rRNA gene sequencing or shotgun metagenomics. These sequence-based methods allow for a more comprehensive and unbiased exploration of the urinary microbiome, enabling the detection and identification of a broader range of bacterial species, including those that are difficult-to-grow or fastidious in laboratory settings. These bacteria may have unique growth requirements or exhibit slow growth rates, making them challenging to detect using conventional culture techniques.

During clinical analyses, the traditional method used to identify known pathogenic microorganisms is SUC method, which consists in 1 microliter of urine on CLED, Mac Conkey or blood agar plates incubated at 35°C in air for 24 hours, which allows the grow of non-fastidious and aerobic microorganisms such as *E. coli* [24]. This method does not allow the growth and identification in routine analyses of anaerobic and slow-growing bacteria, or microorganisms that require special nutrients. These limitations can lead to false-negative results or an underestimation of bacterial load and therefore, different methods are being used in studies to better characterize the urinary microbiome [7].

Enhanced Quantitative Urine Culture is a modified version of the traditional urine culture method, and it was developed as an improved approach for quantifying bacterial growth in urine samples that may go undetected using the standard protocol [59]. In 2014,

Hilt et al. introduced the initial EQUC protocol in a study that identified low-level bacteria in the bladder of healthy women and with symptoms of OAB syndrome. The EQUC method revealed bacterial growth in samples that showed no growth in the SUC method [60].

The EQUC protocol incorporates several modifications to the standard culture technique. It involves using a larger volume of urine for inoculation, typically 100 microliters instead of the usual 1 microliter in SUC, thereby increasing the likelihood of detecting low-level bacterial growth. The urine is then incubated on chocolate, blood and colistin-nalidixic acid agar plates for at least 48 hours at 35°C. The atmosphere conditions should include aerobic, anaerobic and microaerophilic gas mixture. These techniques support the growth of a wider range of bacterial species, including those with specific nutritional requirements or slow growth rates [36,61]. By enhancing the quantitative analysis of bacterial growth in urine samples, EQUC provides a more comprehensive assessment of bacterial load and species diversity. This method has proven useful in research settings and clinical practice, facilitating a better understanding of the role of the urinary microbiota in various urological conditions and improving patient care [59,61].

Culturomics and metaculturomics are emerging fields in microbiology that focus on cultivation and characterization of diverse microbial species from different environmental samples. These approaches aim to expand our understanding of microbial diversity by utilizing advanced culturing techniques and high-throughput methodologies. One of the most cost-effective and rapid screening method used for bacterial identification in culturomics and metaculturomics, especially in the routine of clinical microbiology laboratory is MALDI-TOF mass spectrometry that identifies bacteria from culture isolates based on their protein profiles. The continuous updates of MALDI-TOF databases utilized for routine pathogen identification in clinical microbiology laboratories have facilitated the detection of novel taxa from clinical specimens, significantly enhancing our understanding of their involvement in health and disease. Culturomics has made significant advancements and holds promise for assessing the potential use of certain bacterial strains as probiotics. However, there are significant challenges associated with culturomics, including its labor-intensive nature and limited capacity to analyze large numbers of samples compared to methods like metagenomics. Despite notable progress over time, culturomics still faces limitations in identifying "not yet culturable" microorganisms, hampering a comprehensive understanding of microbial diversity [62].

Metagenomics is a field of study that involves the analysis of genetic material directly obtained from environmental samples, such as soil, water, and the human body. In the context of urobiome characterization, researchers have been using the NGS method that can generate vast amounts of sequence data from mixed microbial communities, identifying bacteria directly from urine samples. This method can be divided

into 2 types, shotgun sequencing that analyzes the entire genetic material present in a sample, and amplicon sequencing, using “marker genes” such as 16 rRNA subunit, which is highly conserved, a result of its critical cellular role. It consists of 9 hypervariable regions (V1-V9) that contain sufficient polymorphisms to achieve accurate taxonomic classification. Unfortunately, the sequencing methods cannot confirm the viability of the microorganisms [7,24,40]. Another limitation for 16S rRNA gene amplicon sequencing is that some bacteria may share high similarity with other members of the same family, even in the variable regions of their 16S rRNA sequences, and the subtle differences in closely related bacteria within the same family usually lead that bacteria can only be identified to the genus level. To achieve more accurate species identification for these bacteria, additional sequencing of alternative genes can be employed [40,63]. While using 16S rRNA gene sequencing, it must be considered that the method necessitates the use of expensive equipment (such as Illumina MiSeq), along with ongoing and sustainable maintenance of these platforms used for sequencing, establishment of specialized laboratory infrastructure, and training of skilled technical personnel [40].

The NGS and EQUIC methods complement each other and therefore should be used simultaneously, especially for current research purposes. The integration of novel techniques and processes has revolutionized our ability to characterize the urinary microbiome, leading to a deeper understanding of its role in health and disease.

4.3 - The urinary microbiome in the Overactive Bladder

The imbalance of the urogenital microbiome has been found to play a role in the development and progression of urologic diseases such as UI, interstitial cystitis/bladder pain syndrome, asymptomatic bacteriuria, neurogenic bladder dysfunction, and OAB syndrome [64,65]. Studies have shown that individuals with OAB have a different urinary microbiome composition compared to those without OAB [17,27,44,66] and they are summarized in **Table 2**. Nevertheless, the result of each study varies depending on sample size, urine collection method and analysis used. One study using a cohort of 10 women with UI and 10 asymptomatic controls found that patients with more severe UI symptoms had a decrease in microbial diversity in their urinary microbiomes [25]. Another study using 30 women with OAB and 25 controls found that the bacterial richness and diversity was lower in OAB samples of women compared to the asymptomatic samples, but bacterial evenness was not significantly different between the two groups, indicating that certain bacterial species or strains may be more prevalent or dominant in the asymptomatic group, contributing to a higher overall richness and diversity compared to the OAB group [19]. Both studies used transurethral catheter for urine collection and sequenced V4 region of 16S rRNA gene, for bacteria identification. The decrease in diversity may lead to an increase in pathogenic bacteria and a decrease in beneficial bacteria, which can contribute to the development of inflammation in the bladder and increased bladder overactivity. On the contrary, Curtiss et al., in a larger study that included 60 women with OAB and 35 asymptomatic controls and using clean-catch midstream urine, had both cohorts growing the same number of genera (5), with no significant difference considering diversity, although different composition between samples [67].

Li et al. conducted a study involving 70 female patients with overactive bladder (OAB), who completed the Overactive Bladder Symptom Score (OABSS) questionnaires (**Appendix 1**). Curiously, they concluded that an elevation in the diversity and richness of the urinary microbiome correlated with more severe OAB symptoms, enabling to divide the groups into mild or moderate/severe symptoms. Sequencing V3-V4 regions of 16S rRNA from urine collected with transurethral catheter, it was possible to identify that *Porphyromonas* genus was associated with severe symptoms of OAB. These bacteria are usually associated with periodontal disease, which can also be involved in worsening or contributing to chronic inflammation in the body and could also further affect nerves and muscles involved in the urinary control [64]. They also found that *Prevotella* genus was associated with a degree of nocturia, and, in emerging studies, this genus has been associated with diseases such as bacterial vaginosis and low-grade inflammation in

gut dysbiosis triggered by HIV, inflammatory bowel disease, metabolic syndromes and asthma [64,68]. Overall bacterial diversity was also higher than in controls, in a study with 25 men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and 25 controls, and using clean-catch midstream urine, when measured by alpha diversity. They also found higher prevalence of anaerobic bacteria compared with controls [69]. A study by Zhou et al. that evaluated the effect of mirabegron treatment for OAB in 64 women, that had urine samples collected by catheterization, showed that patients with no significant decrease in OABSS after treatment, had an abundance of *Prevotella* and *Gardnerella* genera, and that their potential pathogenic mechanisms may have antagonized the effect of the mirabegron [17]. *Gardnerella* has been linked to bacterial vaginosis characterized by inflammation and altered vaginal pH, which may also contribute to OAB symptoms or exacerbate them. The female urethra's position adjacent to the vagina and the possible inflammation in the bladder and pelvic region can affect bladder function and potentially diminish the effectiveness of medications that target smooth muscle relaxation, like mirabegron [17]. High levels of *Prevotella* spp. in the mucosa have also been associated with low levels of systemic inflammation and this factor can also affect mirabegron efficiency [17,68].

Many studies have identified *Lactobacillus* and *Gardnerella* while evaluating the urinary microbiome of OAB patients. The *Lactobacillaceae* family includes gram-positive bacterial genera, some of them widely recognized and typically found in the female vagina. They play a crucial role in maintaining the acidic physiological environment through the production of lactic acid, and some strains present antimicrobial activity through hydrogen peroxide and bacteriocins production. The acidic pH acts as a protective barrier, preventing the growth of common uropathogens, including *Escherichia coli*, and thereby reducing the risk of vaginitis. Some studies suggest that a decrease in urogenital *Lactobacillaceae* species may increase the risk of urinary tract infections and urinary incontinence, which are associated with OAB. It is possible that *Lactobacillaceae* in the bladder also play an important regulatory or protective role in the functional lower urinary tract (LUT) disorders [17,64,70]. Also in Zhou et al. study, patients where the mirabegron was effective had a significantly higher relative abundance of *Lactobacillaceae* than the ineffective group, being suggested that the acidic environment created by *Lactobacillaceae* together with antibacterial products may have enhanced the mirabegron efficacy [17].

While investigating patients with OAB or some OAB symptoms, studies consistently found that the *Lactobacillus* genus was frequently detected in healthy control groups or asymptomatic individuals [19,27,67,71]. Few studies managed to identify the species of *Lactobacillus* possibly involved in OAB symptoms, but Pearce et al., studying the female microbiome in 2014 and 2015, by collecting urine via transurethral catheter

and sequencing V4 regions of 16s rRNA gene, found that *Lactobacillus gasseri* was detected more frequently in the UI cohort (symptomology of OAB) and *Lactobacillus crispatus* most frequently detected in women without LUTS [27,44]. Also, Hilt et al. in a study to evaluate the use of enhanced urine culture techniques (such as EQUC) and 16s rRNA gene sequencing to detect resident bacterial flora in the adult female bladder of 41 female patients with OAB and 24 controls, managed to conclude that *Lactobacillus jensenii* and *Gardnerella vaginalis* were commonly found in OAB patients [60]. Using a different approach, Sun et al. while evaluating if urinary viruses were associated with aggravated symptoms and altered bacteriome in females with OAB, identified that patients with OAB had increased *Lactobacillus iners* and *E. coli* than control patients. Curiously, they also observed that within the OAB group, patients that appeared positive for polyomavirus type 1 (BK virus) and type 2 (JC virus) in the urine had decreased *Lactobacillus inners*, and that these viral genomes were particularly frequent in patients with OAB [66]. This approach was also used in another study to detect viral genomes in the urinary microbiome of women with OAB, revealing that urine samples from OAB patients contained complete genomes of JC Virus while no viral genes were detected in the control group [72].

It is clear that certain bacteria such as *Lactobacillus* spp. are associated with health of the urogenital tract and future research should investigate the potential beneficial effects of probiotics in helping modulate the urinary microbiota and potentially alleviate OAB symptoms, since probiotics can help restore a healthy balance of bacteria in the vagina and might also improve urinary function [16,73]. While the findings of a randomized, placebo-controlled trial investigating the efficacy of intravaginal administration of *Lactobacillus crispatus* probiotic for preventing UTIs demonstrated that using probiotics after cystitis treatment is linked to a reduction in the occurrence of recurrent UTIs [74], other studies regarding other bladder diseases have shown that probiotics administered through bladder instillation allow direct colonization of the urinary bladder inducing a shift in bacterial proportions towards a healthier microbial composition [75]. These findings may indicate that probiotics used by oral intake, vaginal application and even bladder instillation may have positive effects in preventing UTIs and possibly other bladder disorders.

Gardnerella is a frequent and abundant urogenital microbiome member. Although this genus is historically related to bacterial vaginosis, which affects especially women of reproductive age [76], studies in young women without LUTS have found urobiomes dominated by members of this genus, along with *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Escherichia* [77]. In the study of Pearce et al. from 2014, *Gardnerella vaginalis*, along with other species, was more frequently isolated in women with UI [27,44], the same was

found by Hilt et al. in patients suffering from OAB [60]. Since the genus was also the most abundant identified in asymptomatic women, both in sequencing and culturing techniques, the research findings suggested that the presence of *Gardnerella* alone was unlikely to be a reliable indicator of a dysbiotic environment. The existing confusion regarding the pathogenic role of *Gardnerella* is largely attributed to inadequate taxonomic characterization in the past, leading to the inclusion of various species with specific ecological and/or pathological characteristics within the designation of *G. vaginalis*. For four decades, *G. vaginalis* remained the sole recognized species within its genus. However, a recent advancement has emerged with the proposal of an emended description for *G. vaginalis*, along with the introduction of new species and genomospecies within the genus. *Gardnerella* species can exhibit differences in their adherence and cytotoxicity capabilities, implying the existence of potentially pathogenic and symbiotic strains within the genus [27,78].

Other commonly found bacterial genus in patients with OAB or UUI, is *Proteus*; during a case-controlled study by Curtiss et al. that examined the bladder microbiome in women with OAB and healthy controls, through MSU and sequencing V9 region of 16s rRNA, these bacteria had significant more growth from the urine of women with OAB [59]. This result was also found by Gill et al. whilst evaluating the microbiological ecology associated with pyuria and OAB symptoms, that also used MSU [71] and Wu et al., that used collected urine through transurethral catheterization to analyze the urinary microbiome of women with OAB [19]. These bacteria are commonly seen in patients with UTIs, but the precise mechanism through which these organisms can contribute to OAB remains uncertain. However, it is speculated that their involvement may be related to the modification of urothelial ATP signaling, [79] and the identification of bacterial infiltration into urothelial cells and the resulting inflammation have been revealed as crucial factors that trigger the sensitization of sensory nerves innervating the bladder. This sensitization subsequently leads to the manifestation of urgency, frequency, and nocturia symptoms in individuals [6].

Corynebacterium is one of the genera most commonly detected in urine samples of both men and women [60,67]. It is a bacterial genus that comprises small, gram-positive bacilli and has the ability to thrive in both aerobic and facultative anaerobic environments. The relation with patients with OAB or OAB symptoms appears to be different depending on the species. Hilt et al. and Curtiss et al. both sighted in their studies *Corynebacterium* in 14% of the 35 different genera found and 37% of the 95 different genera found, respectively, from their analyzed urine samples [60,67]. Nevertheless, it should be noted the different sample sizes (34 women with OAB and 18 controls and 60 women with OAB and 35 controls) evaluated in the studies, along with

different urine sample collection methods (TUC and MSU, respectively). The species *Corynebacterium coyleae* was more frequently isolated from the cultures obtained by EQUC in the study by Hilt et al. considering both OAB patients and the control cohort, but the study also concluded that the *Corynebacterium* genus was in a higher percentage in OAB patients, than in the control group [60]. *Corynebacterium coyleae* was more frequently isolated in women with UII in the 2014 study by Pearce and his colleagues, along with other species such as *Streptococcus anginosus* and *Actinomyces neuui* (also found in the previous study) [27].

Considering a study that used vaginal estrogen therapy in postmenopausal women with OAB symptoms by Thomas-White and coworkers, using SUC, they identified that the relative abundance of the genus *Corynebacterium* correlated positively with urinary AMP activity after the estrogen treatment, and theorized that the genus may play an important role in female urinary health. AMPs, being small cationic peptides with antimicrobial properties, possess the ability to directly target and eliminate pathogens, making them crucial components of the urinary tract's innate immune system. Produced by various cells in the urinary tract, such as urothelial cells, epithelial cells, and immune cells, AMPs play a vital role in maintaining a balanced microbiota and defending against UTIs by preventing microbial colonization and facilitating pathogen clearance [70]. The differences in these studies show that the genus *Corynebacterium* may include strains that can behave in a beneficial way or not. Other bacterial species have been isolated from studies analyzing the urogenital microbiota of patients with OAB, but not consistently. Some species of *Aerococcus* [19,27,44,60], *Klebsiella* [71,80], *Enterococcus* [60,71], and *Staphylococcus* [19,27,44,66].

Table 2 - Summary of studies on urinary microbiome associated with OAB or OAB symptoms

Population-based Study Design	Identification of OAB symptoms	Sample collection method	Methodology used	Main findings	Reference
34 patients with OAB (women undergoing OAB treatment) 18 controls	Participants' symptoms were characterized with the Pelvic Floor Distress Inventory (PFDI)	Transurethral catheter	Sequencing V4 region of 16S rRNA gene, SUC and EQUC followed by MALDI-TOF	- EQUC identified 35 genera, with <i>Lactobacillus</i> (15%), <i>Corynebacterium</i> (14%), and <i>Streptococcus</i> (12%) being the most prevalent. - Commonly isolated species within each genus included <i>Lactobacillus gasseri</i>, <i>Corynebacterium coyleae</i>, <i>Streptococcus anginosus</i>, <i>Actinomyces neuui</i>, and <i>Staphylococcus epidermidis</i> (in both cohorts). - Control patients had higher percentages of <i>Lactobacillus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Bifidobacterium</i>, and <i>Enterococcus</i> compared to OAB patients. - <i>Corynebacterium</i>, <i>Actinomyces</i>, and <i>Aerococcus</i> were more prevalent in OAB patients than control patients. - <i>Aerococcus</i> and <i>Actinobaculum</i> were exclusively isolated from OAB patients. - <i>Lactobacillus jensenii</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i> were commonly found in OAB patients using 16S rRNA sequencing and culturing. - The majority of bacterial species detected by EQUC were also identified through 16S rRNA gene sequencing of the same urine samples. - Sequencing revealed additional genera not detected by culture, suggesting they were not viable or cultivable under the tested conditions.	Hilt <i>et al</i> , 2014 [60]
1 women with OAB (61 years)	Medical exclusion diagnosis	NA *twice, repeated after one year	SUC, Sequencing V1-V2 and V6 regions of 16S rRNA gene	- Initial sampling showed negative urine dipstick results, positive standard urine culture (SUC) with a single bacterium (<i>Streptococcus viridians</i> group), and diverse microbiome detected by 16S rRNA gene sequencing (additional identification of <i>Atopobium</i>, <i>Ureaplasma</i>, <i>Prevotella</i>, <i>Bacteroides urealyticum</i>). - In the second sampling, symptoms persisted, urine dipstick and SUC were negative, but sequencing still revealed a polymicrobial profile (<i>Streptococcus</i>, <i>Ureaplasma</i>, <i>Prevotella</i>, trace of <i>Bacteroides urealyticum</i>). - Consideration should be given to the use of sequencing methods in patients with chronic urinary symptoms, as they can detect organisms that are difficult to culture using SUC and may have pathogenic potential.	Siddiqui <i>et al</i> , 2014 [82]
60 women with UUI 58 control	Pelvic Floor Impact Questionnaire (PFIQ) and Overactive Bladder Questionnaire (OAB-q)	Transurethral catheter	Sequencing V4 region of 16S rRNA gene, EQUC followed by MALDI-TOF	- <i>Lactobacillus</i> showed lower abundance in women with UUI compared to those without UUI. - <i>Lactobacillus gasseri</i> was more frequently detected in the UUI cohort, while <i>Lactobacillus crispatus</i> was most common in controls. - UUI women had higher prevalence of <i>Actinobaculum schaalii</i>, <i>Actinomyces neuui</i>, <i>Aerococcus urinae</i>, <i>Arthrobacter cumminsii</i>, <i>Corynebacterium coyleae</i>, <i>Gardnerella vaginalis</i>, <i>Oligella urethralis</i>, <i>Streptococcus anginosus</i>, and <i>Staphylococcus</i>. - Some emerging uropathogenic species, such as <i>Actinobaculum schaalii</i>, <i>Aerococcus urinae</i>, <i>Oligella ureolytica</i>, and <i>Arthrobacter cumminsii</i>, were more frequently isolated from UUI women. - <i>Gardnerella</i> was more common in the UUI cohort, but its presence alone does not necessarily indicate a dysbiotic environment since it was also detected in women without UUI. - Many genera found in the urinary microbiome are commonly present in the vaginal tract, including <i>Bifidobacterium</i>, <i>Enterococcus</i>, <i>Actinomyces</i>, <i>Prevotella</i>, and <i>Atopobium</i>.	Pearce <i>et al</i> , 2014 [27]

Table 2 - Summary of studies on urinary microbiome associated with OAB or OAB symptoms

Population-based Study Design	Identification of OAB symptoms	Sample collection method	Methodology used	Main findings	Reference
182 women with UUI (93 positive, 89 negative for DNA sequence)	NA	Transurethral catheter	Sequencing V4 region of 16S rRNA gene was used to dichotomize participants as either DNA sequence-positive or sequence-negative	- Sequence-positive participants were younger, had higher body mass index, experienced more daily UUI episodes, responded better to treatment, and had lower likelihood of developing urinary tract infection. - Bacteria typically associated with UTIs, such as <i>Lactobacillus</i>, <i>Gardnerella</i>, <i>Gardnerella/Prevotella</i>, <i>Enterobacteriales</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Aerococcus</i>, and <i>Bifidobacterium</i>, were identified in sequence-positive urines. - Almost half of the female trial participants with UUI had a dominant genus in their urotype, most commonly <i>Lactobacillus</i> or <i>Gardnerella</i>, with <i>Gardnerella vaginalis</i> and <i>Lactobacillus gasseri</i> being identified. - <i>Lactobacillus crispatus</i> was associated with women without lower urinary tract symptoms. - The status of the female urinary microbiota (sequence-positive or sequence-negative) can be used to subclassify women with UUI, and sequence-positive women can be further categorized based on the dominant bacterial genus or family.	Pearce <i>et al</i> , 2015 [44]
10 women with UUI 10 women control (ages 42-68)	Pelvic Floor Impact Questionnaire (PFIQ) and Overactive Bladder Questionnaire (OABq)	Transurethral catheter	Sequencing V4 region of 16S rRNA gene	- <i>Prevotella</i>, <i>Gardnerella</i>, <i>Arthrobacter</i>, <i>Escherichia-Shigella</i>, <i>Anoxybacillus</i>, and <i>Lactobacillus</i> were the predominant genera identified. - Female urine exhibits a polymicrobial composition with considerable variation among individuals. - <i>Lactobacillus</i> abundance was observed in pre/perimenopausal samples. - Women with more severe UUI symptoms show reduced microbial diversity in their urinary microbiomes. - Fourteen bacteria with significant differences in relative abundances between UUI urine and control urine were identified, including five known UTI-causing pathogens. - Persistent low-grade infection by bacteria not commonly detected by routine cultures may contribute to the irritative symptoms of UUI.	Karstens <i>et al</i> , 2016 [25]
30 women with OAB 25 controls (ages 23-47)	Overactive Bladder Symptom Score (OABSS)	Transurethral catheter	Sequencing V4 region of 16S rRNA gene	- Underrepresented genera in the OAB group included <i>Prevotella</i>, <i>Dialister</i>, <i>Fusobacterium</i>, <i>Jonquetella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Fingoldia</i>, <i>Anaerococcus</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Pyramidobacter</i>, <i>Ureaplasma</i>, <i>Enterococcus</i>, <i>Novosphingobium</i>, and <i>Lactococcus</i>. - Overrepresented genera in the OAB group included <i>Sneathia</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Proteus</i>, <i>Helcococcus</i>, <i>Gemella</i>, <i>Mycoplasma</i>, and <i>Aerococcus</i>. - <i>Proteus</i>, <i>Staphylococcus</i>, and <i>Mycoplasma</i> are commonly associated with UTI. - A persistent low-grade infection by bacteria not commonly detected by standard culture methods may contribute to OAB symptoms. - <i>Gardnerella</i> showed low relative abundance in both cohorts, possibly due to differences in clinical characteristics, ethnicity, or database. - OAB samples had lower bacterial richness and diversity compared to asymptomatic samples, with no significant difference in bacterial evenness. - Asymptomatic women had a more diverse urinary microbiome rich in <i>Lactobacillus</i> compared to the OAB group. A diverse and <i>Lactobacillus</i>-dominated urinary microbiome may have a protective role, consistent with findings from other studies.	Wu <i>et al</i> , 2017 [19]
60 women with OAB 35 controls	clinical questioning for symptoms of OAB and by completion of a validated symptom questionnaire (ICIQ-FLUTS - female lower urinary tract symptoms)	Clean-catch midstream urine	Culturomics and sequencing V9 region of 16S rRNA gene	- The study relied on culture dependent methods, indicating that all identified bacteria are assumed to be viable. - The most frequently cultured bacteria in both cohorts were <i>Staphylococcus</i> (found in 59% of samples), <i>Streptococcus</i> (51%), <i>Corynebacterium</i> (37%), and <i>Lactobacillus</i> (28%). - Patients with bladder symptoms had a significantly lower prevalence of <i>Lactobacillus</i> compared to controls. - <i>Proteus</i> was more commonly cultured from the urine of women with OAB, and it is commonly associated with urinary tract infections. - Both cohorts exhibited similar genus counts (5), with no significant diversity difference.	Curtiss <i>et al</i> , 2017 [67]

Table 2 - Summary of studies on urinary microbiome associated with OAB or OAB symptoms

Population-based Study Design	Identification of OAB symptoms	Sample collection method	Methodology used	Main findings	Reference
23 women patients with OAB 22 asymptomatic controls *Patients were treated with antimuscarinics agents and antibiotics if pyuria implied infection, during the study	International Consultation on Incontinence Questionnaire (ICIQ) and OAB symptoms according to International Continence Society (ICS) criteria	Clean-catch midstream urine *4 times each 4 weeks	SUC in Chromogenic CPS3 agar plates, and fluorescent microscopy	- Routine laboratory culture did not show any differences between patients and controls. - Despite clear and consistent inflammatory and microbiological differences, the gold standard diagnostic test failed to distinguish patients from controls, which is concerning. - <i>E. coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> were the most prevalent species among patients, both known urinary pathogens. - <i>Proteus</i>, <i>Klebsiella sp.</i>, <i>Enterobacter sp.</i>, <i>Serratia sp.</i>, and <i>Pseudomonas</i> were also more commonly found in the OAB group. - <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Citrobacter</i>, and <i>Lactobacillus</i> were more commonly found among asymptomatic controls. - The increased proportions of clue cells suggest greater microbial colonization of urothelial cells in OAB patients.	Gill <i>et al</i> , 2018 [71]
20 women with OAB 10 controls	NA	Transurethral catheter	Metagenomics	- Twelve metagenomes contained phages (viruses that infect bacteria) and/or eukaryotic (viruses that infect eukaryotic organisms) viral sequences. - Sequences similar to viral DNA integrated into bacterial genomes were found in OAB patients, specifically associated with <i>Gardnerella vaginalis</i>, <i>Streptococcus agalactiae</i>, and certain <i>Lactobacillus</i> species. - This similarity suggests the presence of viral genetic elements within these bacterial genomes. - Human polyomavirus JC was detected exclusively in the OAB cohort.	Garretto <i>et al</i> , 2018 [61]
41 post-menopause women with OAB symptoms contributed with data after 12 weeks, undergoing estrogen treatment for at least 6 weeks *only 24 of these patients were under estrogen treatment for 12 weeks	Overactive Bladder Questionnaire (OABq)	Catheterized urine, vaginal swabs, perineal swabs and voided urine	SUC and EQUQ, followed by MALDITOF, HPLC fractionation of urine	- Estrogen treatment for twelve weeks reduced microbial diversity in the vagina but not in other areas. - The bladder showed a significant increase in <i>Lactobacillus</i> levels, while no change was observed in the vagina, perineum, or voided urine. - The increase in bladder <i>Lactobacillus</i> was associated with slight improvements in urgency incontinence symptoms and severity. - The abundance of the genus <i>Corynebacterium</i> positively correlated with urinary AMP activity after estrogen treatment, suggesting its potential role in female urinary health. - It is possible that twelve weeks of hormone treatment is sufficient to impact the bladder ecosystem but not long enough to affect the vaginal ecosystem.	Thomas-White <i>et al</i> , 2020 [70]
30 male patients (>18 years)	International Prostate Symptom Score (IPSS)	First-voided urine samples after prostate massage and rectal swab	Sequencing V3–V5 regions of 16S rRNA gene	- Higher abundance of <i>Lachnospiraceae Blautia</i> was associated with a lower severity of LUTS based on IPSS levels. - Bacteria from the family <i>Ruminococcaceae Gemmiger</i> in the urinary microbiota were associated with increased voiding, storage, and nocturia scores. - Nocturia was associated with unique urinary bacteria including <i>Corynebacterium</i>, <i>Roseburia</i>, and <i>Faecalibacterium</i>.	Holland <i>et al</i> , 2020 [81]
43 women patients (36 postmenopausal)	NA	Transurethral catheter Clean-catch midstream urine	EQUQ and SUC followed by MALDI-TOF	- Single symptoms did not correlate with specific urinary microbes, but five distinct clinical profile clusters were identified. - Group A: Symptoms of odor, cloudiness, and current vaginal estrogen use were observed, with no association with culture results. - Group B: Symptoms of frequency, low back pain, incomplete emptying, and vaginal estrogen use were present, with a significantly higher proportion of <i>Lactobacillus</i>-positive cultures. - Group C: Symptoms of pain/burning, odor, cloudiness, and urgency were reported, with a high proportion of cultures positive for UTI-associated microbes. - Group D: Symptoms of frequency, urgency, pain/burning, and current vaginal estrogen use were observed, with an increased number of cultures showing no growth. - Group E: Symptoms of frequency, urgency, pain/burning, odor, overactive bladder, and sexual activity were reported, with a significantly higher proportion of cultures positive for <i>Klebsiella</i>.	Burnett <i>et al</i> , 2021 [80]

Table 2 - Summary of studies on urinary microbiome associated with OAB or OAB symptoms

Population-based Study Design	Identification of OAB symptoms	Sample collection method	Methodology used	Main findings	Reference
70 women OAB patients (> 18 years old)	Overactive Bladder Symptom Score (OABSS) and 2010 International Continence Society (ICS) definition of OAB	Transurethral catheter	Sequencing V3–V4 region of 16S rRNA gene	- Bladder microbiome is linked to OAB severity. - Increased bacterial diversity and richness are associated with more severe OAB symptoms. - Specific bacterial genera are related to sub-symptoms of OAB, suggesting that urinary dysbiosis can worsen functional bladder disorders. - The Actinobacteria phylum is more abundant in patients with moderate/severe symptoms. - <i>Prevotella</i> is correlated with the degree of nocturia. - Higher abundance of <i>Porphyromona</i> is associated with severe symptoms of nighttime frequency. - The moderate/severe group has a lower proportion of patients with <i>Lactobacillus</i>-dominant urine.	Li <i>et al</i> , 2022 [64]
64 women patients with OAB (ages 18-63)	Overactive bladder symptom scores (OABSS)	Transurethral catheter	Sequencing V3-V4 regions of 16S rRNA gene	- The effective group treated with mirabegron showed significantly higher relative abundance of <i>Lactobacillus</i> and lower relative abundance of <i>Gardnerella</i> and <i>Prevotella</i> compared to the ineffective group. - Patients with high abundance of <i>Lactobacillus</i> and low abundance of <i>Prevotella</i> and <i>Gardnerella</i> experienced decreased OABSS. - Mirabegron was not effective for patients with low levels of <i>Lactobacillus</i> and high levels of <i>Prevotella</i> and <i>Gardnerella</i>.	Zhou <i>et al</i> , 2022 [17]
55 OAB women patients 18 asymptomatic controls (>18 years)	OAB symptoms defined by the ICS; and OAB Symptom Score (OABSS)	Transurethral catheter	DNA Nanoball was made and sequenced by synthesis through BGISEQ-50 platform Search for JC Virus (human polyomavirus type 2) complete genomes from the NCBI database identified through mNGS	- In both control and OAB groups, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes were the most common phyla, with a significant decrease in Bacteroidetes in OAB patients. - The OAB group with positive virus detection showed decreased <i>Lactobacillus iners</i> and increased <i>Staphylococcus epidermidis</i>, <i>Staphylococcus hominis</i>, and <i>Staphylococcus warneri</i>. - OAB patients with virus detection in their urine experienced more severe symptoms. - The most frequently detected virus in urine was the John Cunningham virus, mainly subtype 7 and subtype 2. - Correlation analysis identified age, habit of holding urine, and pelvic surgery history as risk factors for virus infection in OAB patients.	Sun <i>et al</i> , 2022 [66]

4.4 - OAB symptoms and urogenital microbiome

Investigating the potential association between OAB symptoms and the composition of the urogenital microbiome provides another crucial perspective.

The study by Li et al. from 2022 regarding the interplay between bladder microbiota and OAB symptom severity, observed that severe symptoms of nighttime frequency and urgency were accompanied by a higher abundance of the bacterium *Porphyromonas*. This finding suggests a potential link between the presence of *Porphyromonas* and the intensity of these specific OAB symptoms. Li and coworkers also observed that the abundance of another genus, *Prevotella*, was found to be positively correlated with the degree of nocturia, indicating that higher levels of *Prevotella* may contribute to increased nighttime urination [64].

Making a comparison between the urinary and fecal microbiota on LUTS and using the International Prostate Symptom Score (IPSS) to designate symptoms that are also found in OAB patients, such as nocturia, Holland et al. found that an abundance of the genus *Blautia* (family *Lachnospiraceae*) showed a protective correlation against LUTS when looking at the different levels of IPSS severity. On the contrary, while considering urinary operational taxonomic units, bacteria from the family *Ruminococcaceae*, in particular the genus *Gemmiger*, was commonly related to increased voiding, storage, and nocturia scores [81].

Another study focusing primarily on recurrent urinary tract infections from women, most postmenopausal, using 43 urine samples that underwent EQUC and SUC protocols followed by MALDI-TOF for bacterial identification revealed a particular profile that included patients with OAB and/or experiencing symptoms such as frequency and urgency. Interestingly, this group had a significantly greater proportion of positive cultures for *Klebsiella* compared to the other clinical profile groups. *Klebsiella pneumoniae* is a known cause of UTIs, which can result in symptoms including urinary frequency, pain or burning during urination, and urgency. These findings suggest a potential association between *Klebsiella*-positive cultures, OAB diagnosis, and potentially increased symptom severity in affected individuals [80].

Additionally, the study developed by Thomas-White et al. explored the impact of *Lactobacillus* levels in the bladder on postmenopausal women experiencing OAB symptoms. The results demonstrated changes in *Lactobacillus* abundance in the urine of the patients, after submitted to vaginal estrogen therapy, with an increase of the genus levels in catheterized urine samples and these changes were associated with modest improvements in urgency-related symptoms, in accordance with the OABSS. This

suggests that alterations in *Lactobacillus* levels within the urogenital microbiome may influence the severity of urgency incontinence in individuals with OAB [70].

It is important to take into consideration that patients diagnosed with OAB may have a persistent low-grade infection by bacteria that are not commonly detected by standard culture and that could potentially be responsible for the OAB symptoms [19,33,82]. A case report by Siddiqui et al. in 2014 described a 61-year-old woman that experienced symptoms of urgency and urinary incontinence for more than 10 years but presented negative urine dipstick analysis. Only after applying 16s rRNA gene sequencing, it was possible to identify that the patient had a polymicrobial profile in the urine that included *Streptococcus*, *Ureaplasma* and *Prevotella* species [82]. This misdiagnosis can have significant implications for the effectiveness of clinical treatment. In cases where OAB symptoms are associated with an underlying UTI caused by specific bacteria, antibiotic therapy may be prescribed to target and eliminate the infection. A review by Mansfield et al. found that OAB patients are significantly more likely to have potential pathogenic bacteria in their urine and increased bladder inflammation than control donors. While pursuing an understanding of how UTI and bladder inflammation can induce urinary urgency and urinary frequency, the study concluded that OAB patients treated with antibiotics experience lower rates of UTIs, resulting in reduced inflammation and restoring a healthier urinary microbiota. This may contribute to an increased response to anticholinergic medications in the following months, ultimately leading to relief of OAB symptoms [6].

Although these studies provide valuable insights into the potential relationships between specific bacteria and OAB symptoms, further research is needed to fully comprehend the intricate interplay between the urogenital microbiome and OAB. Continued investigation in this field holds the potential to deepen our understanding of OAB pathophysiology and may facilitate the development of targeted interventions aimed at modulating the urogenital microbiome for improved management and treatment of OAB symptoms.

4.5 - Limitations for understanding the microbiome's role in OAB

The investigation of the microbiome's role in OAB faces several limitations that need to be addressed. One limitation is the variability in sampling techniques. Some studies have reported differences in the use of catheterized urine specimens instead of voided midstream urine due to possible contaminations of microbial flora from the genital tract [47,64]. This variability in sample collection methods along with differences in sample size used in studies and demographic characteristics of the patients such as age, BMI, race/ethnicity, also affect accuracy and comparability of microbiome data [64]. Considering culture-independent or enhanced culture techniques, multiple studies have consistently shown that these methods exhibit a higher microbial detection rate compared to SUC techniques. Nonetheless, these approaches are not without limitations. Some of these limitations include the inability to identify and characterize microbes present in quantities below the detection threshold used in the study (usually <10 colony forming units/ml) and the possibility that intact intracellular bacterial communities are not released into urine [80].

The reliance on subjective measures poses limitations in OAB studies. The use of OABSS to assess the severity of symptoms relies on patients' self-reporting, which may be influenced by subjective feelings [64]. Objective measures, such as bladder diary recordings, is a tool used by professionals to determine the type of bladder problems being experienced, but additional markers could provide more accurate and reliable data in evaluating OAB symptoms.

Another limitation is the lack of conclusive studies examining the relationship between intestinal and vaginal microbiota and the urobiome, including their implications in the development of UTIs. The increased occurrence of UTIs in women compared to men has led to considerations that the colonization of the bladder may originate from the genital region due to the relatively smaller size of the female urethra, along with evidence that show uropathogenic bacteria harbored in the vagina [83]. Also, the development of these infections typically begins with the contamination of the periurethral space by uropathogens that reside in the gastrointestinal tract, colonize the urethra and migrate to the bladder through ascending pathways [84]. Recent evidence analyzing the gut, vagina, and urinary bladder conclude that these anatomical sites appear to form a triad that play a collective role in the pathogenesis of UTIs. The resident microbiota in these sites can either serve as a potential reservoir of uropathogenic bacteria or act as a protective barrier against their ability to cause UTIs [85]. Exploring this relationship could offer valuable insights into prevention and treatment strategies for UTIs, especially in the use of probiotics and deciding the best route administration to best reach the urinary tract.

Moreover, uncertainties exist regarding the predominant microbiome in diseased and non-diseased individuals. For example, the predominance of the *Lactobacillaceae* family does not differ between adult women with mixed urinary incontinence and asymptomatic women of the same age group, although specific members may be associated with urinary symptoms [7]. Further research is needed to elucidate the role of specific microbial species in OAB.

4.6 - Future Directions

The traditional notion of a "sterile urine" has been challenged, as it is now widely recognized that a urinary microbiota exists in the urogenital tract without causing infections. This area of research holds significant importance and remains largely unexplored. As previously reviewed, studies have revealed notable differences in the urogenital microbiome of patients with OAB compared to those with a healthy background. These differences offer valuable insights for understanding the syndrome, improving diagnostic methods, and exploring potential treatment interventions.

To advance our understanding of the microbiome's role in OAB, several perspectives and future directions should be considered. First, the development of urobiome-specific databases is crucial. Current public databases are inadequate for urinary microbiome studies due to the lack of urobiome-specific genomes. Establishing such databases would help in characterizing the unique microbial communities associated with bladder health and diseases, considering the variability under different environmental conditions [7].

Additionally, exploring alternative techniques for assessing the microbiome is essential. While culture-independent methods can identify a large number of bacterial species, the presence of DNA alone does not confirm metabolically active bacteria living within the bladder. Investigating techniques that provide information on viable and active microbial populations could enhance our understanding of the functional role of the microbiome in OAB [67].

Advancing our knowledge of the intricate microbial population within the male and female urinary tract, both in healthy individuals and those affected by disease, is a crucial undertaking. Investigating the urinary microbiome prior to bladder disturbances, such as UTI, could provide valuable insight into the correlation between microbial composition and susceptibility to infection, especially in individuals without underlying pathological conditions.

The relationship between the urinary microbiota and OAB treatment response needs further investigation. Studies have suggested that responders to drug treatments, such as antimuscarinics, may have fewer bacteria and a less diverse community. However, more research is required to predict the ideal pharmacotherapy for individual OAB patients, including the potential use of antibiotics or probiotics in treatment [16]. Despite the reported potential benefits of probiotic therapy in preventing and treating bladder diseases, the scientific evidence supporting these claims is currently limited and inconclusive and deserves further research [16]. Combination of treatments in different scenarios might contribute to the development of new therapeutic approaches.

Finally, the development of targeted drug delivery systems represents a promising perspective. Overcoming the challenges associated with the bladder's anatomy and physiology could improve the efficacy and durability of treatment options. Innovative drug delivery approaches that bypass first-pass metabolism, minimize drug dilution during urine storage, and optimize drug distribution within the bladder may lead to more effective and long-lasting treatments for OAB [16].

In conclusion, while progress has been made in understanding the microbiome's role in OAB, several limitations persist. By addressing these limitations and considering the perspectives discussed, further research can advance our understanding of the microbiome-OAB relationship, leading to improved diagnostics, personalized treatments, and novel therapeutic interventions for patients with OAB.

5 - Conclusions

The urogenital microbiome has emerged as a potential factor influencing the development and progression of OAB. Although the exact mechanisms remain unclear, evidence suggests that alterations in the urinary microbiome may play a role in OAB pathogenesis. Modulating the urinary microbiome presents a promising avenue for OAB treatment.

It is clear that some bacteria are linked to health in the urogenital microbiome, but their diversity can vary considering age, gender and clinical condition. Other bacteria have been identified in more abundance in OAB patients, with some links to symptomatology that deserve further investigations, such as *Porphyromonas* and *Prevotella*, both genera significantly present in OAB patients, and related to nocturia symptoms. It was evident from the studies that the *Lactobacillaceae* family is very present, especially in the FUM. Many species are linked with health and alterations in their balance can be associated with severity of urgency incontinence in individuals with OAB, but evidence shows that not all species are beneficial, and researchers must consider evaluating the presence of newly discovered *Lactobacillus* species in OAB patients.

This monograph has highlighted the diverse and sometimes contradictory findings regarding the differences between the urogenital and urinary microbiome of individuals with OAB, UI, UTI and some other bladder conditions compared to healthy controls. It must be taken under consideration that there are limitations while critically assessing and comparing these studies due to various factors such as sample size, demographic characteristics of patients analyzed, urine collection methods, and bacterial identification techniques. It would be interesting for future studies to address these limitations and establish a "core microbiome", along with investing in research to better understand the bladder-vagina-gut axis.

Furthermore, limitations in current microbial identification techniques, particularly 16S rRNA gene sequencing, hinder the accurate identification of bacterial species. Therefore, further research is warranted to optimize microbial identification methods and establish a robust microbial community profile in healthy individuals. While exploring the role of metagenomics in the clinical setting, it is essential to consider the cost-effectiveness of implementing these techniques on a larger scale. Future studies should focus on assessing the practicality and economic feasibility of applying metagenomic approaches in routine clinical practice, or at least in more challenging cases.

Understanding the complex interplay between the urogenital microbiome and OAB holds significant potential for improving our understanding of the condition and developing novel therapeutic strategies. Further investigations are needed to address methodological

limitations, establish a core microbial community, and evaluate the clinical applicability of metagenomic approaches.

6 - References

1. Dobrek Ł, Juszcak K, Wyczółkowski M, Thor PJ. Current management and future perspectives of overactive bladder (OAB) pharmacotherapy. *Acta Pol Pharm.* 2011;68(6):807-821.
2. Wein AJ, Rovner ES. Definition and epidemiology of overactive bladder. *Urology.* 2002 Nov;60(5 Suppl 1):7–12; discussion 12.
3. Scott AJ. The longevity economy. *Lancet Healthy Longev.* 2021 Dec;2(12):e828–35.
4. Petros P. A ligamentous explanation for overactive bladder symptoms as defined by International Continence Society in the female. *Cent European J Urol.* 2018;71(1):105–7.
5. Abrams P, Kelleher CJ, Kerr LA, Rogers RG. Overactive bladder significantly affects quality of life. *Am J Manag Care.* 2000 Jul;6(11 Suppl):S580-590.
6. Mansfield KJ, Chen Z, Moore KH, Grundy L. Urinary Tract Infection in Overactive Bladder: An Update on Pathophysiological Mechanisms. *Front Physiol.* 2022;13:886782. Published 2022 Jul 4.
7. Bae S, Chung H. The Urobiome and Its Role in Overactive Bladder. *Int Neurourol J.* 2022;26(3):190-200.
8. Sivalingam N, Loh KY. Concepts in the management of the overactive bladder in women. *Med J Malaysia.* 2012;67(1):137-142.
9. Scarneciu I, Lupu S, Bratu OG, et al. Overactive bladder: A review and update. *Exp Ther Med.* 2021;22(6):1444.
10. Hutchinson A, Nesbitt A, Joshi A, Clubb A, Perera M. Overactive bladder syndrome: Management and treatment options. *Aust J Gen Pract.* 2020;49(9):593-598.
11. Uzun H, Yilmaz A, Kemik A, Zorba OU, Kalkan M. Association of insulin resistance with overactive bladder in female patients. *Int Neurourol J.* 2012;16(4):181-186.
12. de Boer TA, Slieker-ten Hove MC, Burger CW, Vierhout ME. The prevalence and risk factors of overactive bladder symptoms and its relation to pelvic organ prolapse symptoms in a general female population. *Int Urogynecol J.* 2011;22(5):569-575.
13. Tomaszewski J. Postmenopausal overactive bladder. *Prz Menopauzalny.* 2014;13(6):313-329.
14. Pratt TS, Suskind AM. Management of Overactive Bladder in Older Women. *Curr Urol Rep.* 2018;19(11):92. Published 2018 Sep 10.
15. Steers WD. Pathophysiology of overactive bladder and urge urinary incontinence. *Rev Urol.* 2002;4 Suppl 4(Suppl 4):S7-S18.
16. Zoglam R, Lazauskaite S, Glickman S, Zaitseva L, Ilie PC, Qi S. Emerging molecular mechanisms and genetic targets for developing novel therapeutic strategies for treating bladder diseases. *Eur J Pharm Sci.* 2022;173:106167.
17. Zhou Z, Qiu Y, Li K, et al. Unraveling the impact of *Lactobacillus* spp. and other urinary microorganisms on the efficacy of mirabegron in female patients with overactive bladder. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:1030315. Published 2022 Nov 14.
18. Willis-Gray MG, Dieter AA, Geller EJ. Evaluation and management of overactive bladder: strategies for optimizing care. *Res Rep Urol.* 2016;8:113-122. Published 2016 Jul 27.
19. Wu P, Chen Y, Zhao J, et al. Urinary Microbiome and Psychological Factors in Women with Overactive Bladder. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:488. Published 2017 Nov 27.
20. Antunes-Lopes T, Vale L, Coelho AM, et al. The Role of Urinary Microbiota in Lower Urinary Tract Dysfunction: A Systematic Review. *Eur Urol Focus.* 2020;6(2):361-369.
21. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):260-270. Published 2012 Mar 13.
22. Schneeweiss J, Koch M, Umek W. The human urinary microbiome and how it relates to urogynecology. *Int Urogynecol J.* 2016;27(9):1307-1312. doi:10.1007/s00192-016-2944-5
23. Fricke WF, Maddox C, Song Y, Bromberg JS. Human microbiota characterization in the course of renal transplantation. *Am J Transplant.* 2014;14(2):416-427.
24. Wolfe AJ, Brubaker L. "Sterile Urine" and the Presence of Bacteria. *Eur Urol.* 2015;68(2):173-174.
25. Karstens L, Asquith M, Davin S, et al. Does the Urinary Microbiome Play a Role in Urgency Urinary Incontinence and Its Severity?. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:78. Published 2016 Jul 27.

26. Tyagi P. Pathophysiology of the urothelium and detrusor. *Can Urol Assoc J.* 2011;5(5 Suppl 2):S128-S130.
27. Pearce MM, Hilt EE, Rosenfeld AB, et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *mBio.* 2014;5(4):e01283-14. Published 2014 Jul 8.
28. Peyronnet B, Mironska E, Chapple C, et al. A Comprehensive Review of Overactive Bladder Pathophysiology: On the Way to Tailored Treatment. *Eur Urol.* 2019;75(6):988-1000.
29. Meng E, Lin WY, Lee WC, Chuang YC. Pathophysiology of overactive bladder. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms.* 2012;4:48-55.
30. Rohrmann S, Smit E, Giovannucci E, Platz EA. Association between markers of the metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Int J Obes (Lond).* 2005;29(3):310-316.
31. Andersson KE, Wein AJ. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):581-631.
32. Pillalamarri N, Shalom DF, Pilkinton ML, et al. Inflammatory Urinary Cytokine Expression and Quality of Life in Patients With Overactive Bladder. *Female Pelvic Med Reconstr Surg.* 2018;24(6):449-453.
33. Antunes-Lopes T, Cruz F. Urinary Biomarkers in Overactive Bladder: Revisiting the Evidence in 2019. *Eur Urol Focus.* 2019;5(3):329-336. doi:10.1016/j.euf.2019.06.006
34. Christ GJ. Gene therapy treatments for erectile and bladder dysfunction. *Curr Urol Rep.* 2004;5(1):52-60.
35. Kashyap M, Kawamorita N, Tyagi V, et al. Down-regulation of nerve growth factor expression in the bladder by antisense oligonucleotides as new treatment for overactive bladder. *J Urol.* 2013;190(2):757-764.
36. Perez-Carrasco V, Soriano-Lerma A, Soriano M, Gutiérrez-Fernández J, Garcia-Salcedo JA. Urinary Microbiome: Yin and Yang of the Urinary Tract. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:617002. Published 2021 May 18.
37. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2369-2379. doi:10.1056/NEJMra1600266
38. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract--a role beyond infection. *Nat Rev Urol.* 2015;12(2):81-90.
39. Siddiqui H, Nederbragt AJ, Lagesen K, Jeansson SL, Jakobsen KS. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol.* 2011;11:244. Published 2011 Nov 2.
40. Muhamad Rizal NS, Neoh HM, Ramli R, et al. Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(10):816. Published 2020 Oct 14.
41. Franco-Duarte R, Černáková L, Kadam S, et al. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms.* 2019;7(5):130. Published 2019 May 13.
42. Wilson ML. Detection of Bacteriuria and Pyuria. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 23rd ed. Elsevier; 2017: chap 28.
43. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1376-1383.
44. Pearce MM, Zilliox MJ, Rosenfeld AB, et al. The female urinary microbiome in urgency urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(3):347.e1-347.e11.
45. Ugarcina Perovic S, Ksiezarek M, Rocha J, Cappelli EA, Sousa M, Ribeiro TG, et al. Urinary Microbiome of Reproductive-Age Asymptomatic European Women. *Microbiology Spectrum.* 2022 Nov 16;10(6):e01308-22.
46. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449(7164):804-810.
47. Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med.* 2012;4(132):132ra52.
48. Lewis DA, Brown R, Williams J, et al. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:41. Published 2013 Aug 15.
49. Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, et al. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic

- bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med*. 2012;10:174. Published 2012 Aug 28.
50. Gottschick C, Deng ZL, Vital M, et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017;5(1):99. Published 2017 Aug 14.
 51. Petrova MI, Reid G, Vaneechoutte M, Lebeer S. *Lactobacillus iners*: Friend or Foe? *Trends in Microbiology*. 2017;25(3):182-191.
 52. Zheng N, Guo R, Wang J, Zhou W, Ling Z. Contribution of *Lactobacillus iners* to Vaginal Health and Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:792787.
 53. Vaneechoutte M. *Lactobacillus iners*, the unusual suspect. *Research in Microbiology*. 2017;168(9-10):826-836.
 54. Ksiezarek M, Ugarcina-Perovic S, Rocha J, Grosso F, Peixe L. Long-term stability of the urogenital microbiota of asymptomatic European women. *BMC Microbiol*. 2021 Feb 25;21(1):64.
 55. Ksiezarek M, Novais Â, Peixe L. The Darkest Place Is under the Candlestick-Healthy Urogenital Tract as a Source of Worldwide Disseminated Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Lineages. *Microorganisms*. 2022 Jan;10(1):27.
 56. Qin J, Shi X, Xu J, et al. Characterization of the Genitourinary Microbiome of 1,165 Middle-Aged and Elderly Healthy Individuals. *Front Microbiol*. 2021;12:673969. Published 2021 Aug 19.
 57. Liu F, Ling Z, Xiao Y, et al. Characterization of the urinary microbiota of elderly women and the effects of type 2 diabetes and urinary tract infections on the microbiota. *Oncotarget*. 2017;8(59):100678-100690. Published 2017 Sep 21.
 58. Karstens L, Asquith M, Caruso V, et al. Community profiling of the urinary microbiota: considerations for low-biomass samples. *Nat Rev Urol*. 2018;15(12):735-749.
 59. Xu R, Deebel N, Casals R, Dutta R, Mirzazadeh M. A New Gold Rush: A Review of Current and Developing Diagnostic Tools for Urinary Tract Infections. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(3):479. Published 2021 Mar 9.
 60. Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):871-876.
 61. Price TK, Dune T, Hilt EE, et al. The Clinical Urine Culture: Enhanced Techniques Improve Detection of Clinically Relevant Microorganisms. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1216-1222.
 62. Lagier JC, Dubourg G, Million M, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16:540-550.
 63. Fouhy F, Clooney AG, Stanton C, Claesson MJ, Cotter PD. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiology*. 2016;16(1):123.
 64. Li K, Chen C, Zeng J, et al. Interplay between bladder microbiota and overactive bladder symptom severity: a cross-sectional study. *BMC Urol*. 2022 Mar 21;22(1):39.
 65. Bhide A, Tailor V, Khullar V. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome and recurrent urinary tract infection and the potential role of the urinary microbiome. *Post Reprod Health*. 2020;26(2):87-90.
 66. Sun Q, Li L, Zhou H, et al. The detection of urinary viruses is associated with aggravated symptoms and altered bacteriome in female with overactive bladder. *Front Microbiol*. 2022;13:984234. Published 2022 Sep 23.
 67. Curtiss N, Balachandran A, Krska L, Peppiatt-Wildman C, Wildman S, Duckett J. A case controlled study examining the bladder microbiome in women with Overactive Bladder (OAB) and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;214:31-35.
 68. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017;151(4):363-374.
 69. Shoskes DA, Altemus J, Polackwich AS, Tucky B, Wang H, Eng C. The Urinary Microbiome Differs Significantly Between Patients With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome and Controls as Well as Between Patients With Different Clinical Phenotypes. *Urology*. 2016;92:26-32.
 70. Thomas-White K, Taege S, Limeira R, et al. Vaginal estrogen therapy is associated with increased *Lactobacillus* in the urine of postmenopausal women with overactive bladder symptoms. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(5):727.e1-727.e11.
 71. Gill K, Kang R, Sathiananthamoorthy S, Khasriya R, Malone-Lee J. A blinded observational cohort study of the microbiological ecology associated with pyuria and overactive bladder symptoms. *Int Urogynecol J*. 2018;29(10):1493-1500.

72. Garretto A, Thomas-White K, Wolfe AJ, Putonti C. Detecting viral genomes in the female urinary microbiome. *J Gen Virol*. 2018;99(8):1141-1146.
73. Reid G, Burton J, Devillard E. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. *MedGenMed*. 2004;6(1):49. Published 2004 Mar 29
74. Stapleton AE, Au-Yeung M, Hooton TM, et al. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(10):1212-1217.
75. Forster CS, Hsieh MH, Pérez-Losada M, et al. A single intravesical instillation of *Lactobacillus rhamnosus* GG is safe in children and adults with neuropathic bladder: A phase Ia clinical trial. *J Spinal Cord Med*. 2021;44(1):62-69.
76. Coudray MS, Madhivanan P. Bacterial vaginosis-A brief synopsis of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020;245:143-148.
77. Price TK, Hilt EE, Thomas-White K, Mueller ER, Wolfe AJ, Brubaker L. The urobiome of continent adult women: a cross-sectional study. *BJOG*. 2020;127(2):193-201.
78. Harwich MD, Alves JM, Buck GA, et al. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. *BMC Genomics*. 2010;11:375.
79. Contreras-Sanz A, Krska L, Balachandran AA, et al. Altered urothelial ATP signaling in a major subset of human overactive bladder patients with pyuria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(4):F805-F816.
80. Burnett LA, Hochstedler BR, Weldon K, Wolfe AJ, Brubaker L. Recurrent urinary tract infection: Association of clinical profiles with urobiome composition in women. *Neurourol Urodyn*. 2021;40(6):1479-1489.
81. Holland B, Karr M, Delfino K, et al. The effect of the urinary and faecal microbiota on lower urinary tract symptoms measured by the International Prostate Symptom Score: analysis utilising next-generation sequencing. *BJU Int*. 2020;125(6):905-910.
82. Siddiqui H, Lagesen K, Nederbragt AJ, Eri LM, Jeansson SL, Jakobsen KS. Pathogens in Urine from a Female Patient with Overactive Bladder Syndrome Detected by Culture-independent High Throughput Sequencing: A Case Report. *Open Microbiol J*. 2014;8:148-153. Published 2014 Dec 31.
83. Lewis AL, Gilbert NM. Roles of the vagina and the vaginal microbiota in urinary tract infection: evidence from clinical correlations and experimental models. *GMS Infect Dis*. 2020;8:Doc02. Published 2020 Mar 26.
84. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015 May;13(5):269–84.
85. Meštrović T, Matijašić M, Perić M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, Verbanac D. The Role of Gut, Vaginal, and Urinary Microbiome in Urinary Tract Infections: From Bench to Bedside. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Dec 22;11(1):7.

7 - Appendix

1 - Example of OABSS questionnaire

OABSS stands for "Overactive Bladder Symptom Score," which is a questionnaire used to evaluate the severity of overactive bladder (OAB) symptoms in patients. The OABSS is a self-administered questionnaire that consists of four questions related to the key symptoms of OAB. The questions are as follows:

Question	Frequency	Score
1. How many times do you typically urinate from waking in the morning until sleeping at night?	≤ 7	0
	8–14	1
	≥ 15	2
2. How many times do you typically wake up to urinate from sleeping at night until waking in the morning?	0	0
	1	1
	2	2
	≥ 3	3
3. How often do you have a sudden desire to urinate, which is difficult to defer?	Not at all	0
	Less than once a week	1
	Once a week or more	2
	About once a day	3
	2–4 times a day	4
	5 times a day or more	5
4. How often do you leak urine because you cannot defer the sudden desire to urinate?	Not at all	0
	Less than once a week	1
	Once a week or more	2
	About once a day	3
	2–4 times a day	4
	5 times a day or more	5

Each question is scored on a scale of 0-5, with 0 indicating "not at all" and 5 indicating "very much." The total OABSS score is calculated by adding the scores of the four questions, with a total score ranging from 0 to 20. A higher OABSS score indicates a greater severity of OAB symptoms.

Reference of Appendix

1- Lee SD, Chung JM, Kang DI, Ryu DS, Cho WY, Park S. Efficacy and Tolerability of Solifenacin 5 mg Fixed Dose in Korean Children with Newly Diagnosed Idiopathic Overactive Bladder: a Multicenter Prospective Study. *J Korean Med Sci.* 2017;32(2):329-334.

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio

Letícia Corrêa Lopes



2023



Relatório de Estágio

Letícia Corrêa Lopes

Relatório de Estágio do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de
Mestre em Análises Clínicas

Este estágio foi orientado pela Prof. Doutora Maria Eugênia Ribeiro Pinto (Faculdade de Farmácia Universidade do Porto, Portugal) e Doutora Sofia Botelho Moniz (Laboratório Unilabs, Porto, Portugal).

Junho de 2023

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTES RELATÓRIOS DE ESTÁGIO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Letícia Corrêa Lopes

Letícia Corrêa Lopes

Resumo

Este relatório descreve um estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Unilabs, que faz parte de uma empresa com uma extensa rede de laboratórios em Portugal. O estágio ocorreu na zona industrial do Porto e teve foco no processamento e validação de amostras recebidas de várias unidades distribuídas pela região. O laboratório oferece serviços como coleta de sangue, urina e sêmen, mas seu principal papel está na recepção, processamento e validação de amostras. O estágio proporcionou a oportunidade de explorar diferentes departamentos dentro do laboratório, incluindo triagem de soros, processamento pré-analítico de urina, hematologia, bioquímica (core), microbiologia e imunohematologia. Este relatório oferece uma visão abrangente da experiência de estágio, incluindo as atividades e conhecimentos adquiridos em cada departamento. Ele destaca a infraestrutura do laboratório, equipamentos, metodologias utilizadas, competências de seus profissionais e, especialmente, a validação de amostras clínicas, demonstrando o papel significativo desempenhado pelos profissionais de análises clínicas do distrito do Porto e além.

Palavras-chave: Análises Clínicas; validação; microbiologia; bioquímica

Abstract

This report describes an internship conducted at Unilabs Clinical Analysis Laboratory, which is part of a company with an extensive network of laboratories in Portugal. The internship took place in the industrial zone of Porto and focused on the processing and validation of samples received from various units distributed across the region. The lab offers services such as blood, urine, and semen collection but however, its main role lies in receiving, processing and validating samples. The internship provided an opportunity to explore different departments within the laboratory, including sample collection unit, serum screening, pre-analytical urine processing, hematology, biochemistry (core), microbiology, special analyses, and immunohematology. This report offers a comprehensive overview of the internship experience, covering the activities and knowledge gained in each department. It highlights the infrastructure of the lab, equipment, methodologies used, personnel capabilities and specially the validation of clinical samples, demonstrating the significant role the clinical analysis professionals play within the Porto district and beyond.

Keywords: Clinical Analysis; validation; microbiology; biochemistry

Índice

Introdução.....	1
1. Laboratório Unilabs.....	2
2. Triagem de soros.....	2
3. Hematologia.....	3
3.1 Validação.....	6
3.1.1 Índices eritrocitários.....	7
3.1.2 Leucograma.....	9
3.1.3 Análise do esfregaço sanguíneo.....	12
4. Bioquímica (CORE).....	12
4.1 Validação.....	14
4.2 Imunoensaios.....	15
4.2.1 IMMULITE® 2000 XPI Immunoassay System (Siemens).....	16
4.2.2 VIDAS® (bioMérieux).....	17
4.2.3 cobas®e411.....	17
4.2.4 UniCel DxI (Beckman Coulter).....	17
4.2.5 Validação.....	18
4.3 Coagulação.....	19
5. Medicina transfusional e Imunohematologia.....	20
5.1 Pedidos de Transfusões Sanguíneas.....	21
5.2 Fundamento dos testes de GS e PAI.....	22
6. Pré-analítico de urinas e fezes.....	25
7. Microbiologia.....	27
7.1 Urinas.....	27
7.2 Identificação e Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	30
7.3 Controle Externo.....	32
7.4 Fezes e outros materiais.....	33
7.5 Bebê Vida.....	35
7.6 Validação.....	35
7.6.1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	37
7.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA).....	38
7.6.3 Fezes.....	39
7.6.4 <i>Enterobacteriaceae</i> Resistentes a Carbapenems.....	40
7.6.5 Exsudados vaginais, uretrais e espema.....	41
7.6.6 Expectorações.....	42

Conclusão.....	44
Referências Bibliográficas.....	45
Anexos.....	46

Índice de Figuras

Figura 1 - Ilustração de um esfregaço sanguíneo.....	05
Figura 2 - Alterações na forma eritrocitária.....	08
Figura 3 - Gráfico de Dispersão Leucocitária indicando Monócitos, Linfócitos, Basófilos, Neutrófilos e Eosinófilos. Tamanho celular(SFL) x Complexidade celular (SSC).....	10
Figura 4 - Mancha de Gumprecht assinalado com flecha e linfócitos.....	11
Figura 5 - Linha contendo Atellica® Sample Handler, Atellica® CH e Atellica® IM.....	13
Figura 6 - Colocação de um cartucho de reagente no equipamento IMMULITE 2000 XPi.....	16
Figura 7 - Equipamento Sysmex® CS-5100.....	19
Figura 8 - Exemplo de pulseira de requisição transfusional com QR code.....	22
Figura 9 - Ilustração de graus de aglutinação.....	23
Figura 10 - Exemplo de parte de um Painel de Identificação de Anticorpos Irregulares.....	24
Figura 11 - Sistema Diagnóstico de Parasitas -ParasiTrap®.....	26
Figura 12 - Técnica de Esgotamento em 3 quadrantes.....	29
Figura 13 - Painéis utilizados para o TSA no MicroScan® WalkAway®.....	31
Figura 14 - Exemplo de Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos manual.....	37
Figura 15 - Exemplo de uma placa com meio seletivo cromogênico MRSA e crescimento de estirpe resistente de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	38
Figura 16 - Exemplo de meio XLD com crescimento de <i>Salmonella</i>.....	40
Figura 17 - <i>Gardnerella vaginalis</i> indicado pelas setas, ao redor de células epiteliais. Lâmina corada por gram.	42

Introdução

A análise clínica é uma área de extrema importância na detecção, prevenção e monitorização de diversas patologias, possibilitando um diagnóstico preciso e consequentemente a escolha de um tratamento adequado. Como estudante do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, tive a oportunidade de realizar um estágio curricular no laboratório UNILABS, muito reconhecido pela sua excelência de serviço e numerosa gama de unidades laboratoriais, de maneira a aprimorar meus conhecimentos e habilidades práticas.

A saúde em Portugal tem um histórico de desafios e conquistas, e é possível observar que a análise clínica tem sido fundamental para a melhoria da saúde pública. Nos últimos anos, o país tem enfrentado um aumento de doenças crônicas como, por exemplo, a diabetes e a hipertensão, bem como o aumento de infeções hospitalares e resistência a antimicrobianos. Por meio de exames laboratoriais, do conhecimento e domínio das técnicas de análises clínicas, é possível diagnosticar, monitorizar e analisar os dados dessas patologias, contribuindo para a qualidade de vida da população.

Através da rápida evolução tecnológica dos últimos anos, foi possível adicionar na rotina laboratorial equipamentos automatizados com métodos mais precisos e sensíveis, além de acelerar a realização das análises e diminuir significativamente a margem de erro humano. Por isso, é essencial que exista um conhecimento aprimorado e contínuo dos funcionários, tanto para manipulação correta dos novos equipamentos, como implementação de controlos internos e participação em avaliações externas. Essa automatização também abrange os sistemas informáticos e minimiza erros humanos em processos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos.

Durante o estágio, pude adquirir uma experiência valiosa, aplicando os conhecimentos teóricos obtidos ao longo das aulas, nas práticas laboratoriais. Além disso, pude observar a importância da organização e padronização das atividades laboratoriais, seguindo as normas e regulamentos exigidos pelos órgãos reguladores.

Este relatório tem como objetivo apresentar as atividades desenvolvidas, observadas e acompanhadas, durante o estágio, assim como técnicas, metodologias e principalmente a validação dos resultados para a emissão do boletim médico. É importante salientar que o estágio foi realizado num laboratório de grande dimensão, com muitos equipamentos e funcionários, e um grande volume de amostras recebidas diariamente, o que possibilitou a ampliação dos conhecimentos além da sala de aula, permitiu um preparo para enfrentar o mercado de trabalho e promoveu uma maior valorização dos profissionais da área de análises clínicas.

1. Laboratório Unilabs

A Unilabs trata-se de uma empresa que possui uma enorme rede de laboratórios que foram adquiridos em 2006 e, desde então, foi crescendo rapidamente e, hoje em dia, contém cerca de mais de mil unidades em Portugal.

O estágio em questão, foi realizado no laboratório de análises clínicas Unilabs Manuel Pinto Azevedo, localizado na zona industrial da cidade do Porto, com funcionamento todos os dias, exceto domingos e feriados. Realiza algumas coletas como sangue, urina e esperma, mas a sua maior atuação é no processamento e validação de amostras de outras unidades distribuídas pela região. É uma das maiores unidades do país, e portanto possui infraestruturas, equipamentos, material e pessoal para receber amostras de diversas unidades do distrito do Porto e fora dele, como a Unilabs de Braga, Lisboa, Algarve, entre outras, além de alguns laboratórios externos.

O laboratório onde foi realizado o estágio, é dividido entre os setores de coleta, triagem de soros, pré-analítico de urinas, hematologia, bioquímica (core), microbiologia, análises especiais e imunohematologia. Durante o estágio, a aluna teve oportunidade de conhecer todos os setores do laboratório, exceto, coleta e análises especiais, e irá relatar como é feito o processamento das amostras em cada um deles, além dos conhecimentos adquiridos.

2. Triagem de soros

Todas as amostras que chegam de outros laboratórios de outras unidades da Unilabs, ou laboratórios externos, devem passar pela triagem para, em alguns casos, serem registadas no sistema, aliquotadas, armazenadas ou separadas, para seguirem aos seus determinados setores.

A triagem de soros é principalmente responsável por triar as amostras para o setor de hematologia, como amostras de hemograma, velocidade de sedimentação; pesquisa de grupos e teste de coombs para a imunohematologia; oligoelementos para a bioquímica especial; hormonas, triglicédeos, creatinina e outros testes para a bioquímica; amostras para a realização de PCR (polymerase chain reaction) para a biologia molecular; testes de coagulação, entre outros.

O setor realiza a centrifugação de todos os tubos com gel separador, para a bioquímica, que necessita apenas da porção com o soro da amostra. É importante a verificação individual de possíveis fibrinas no tubo, para não ocorrer entupimento do equipamento que aspira o soro para a realização da análise. A presença de fibrina é

normal, trata-se de uma proteína fibrosa envolvida na coagulação de sangramentos que, deve ser retirada do tubo com o auxílio de um palito, e descartada. Tubos com citrato de sódio onde a análise necessita do plasma, também devem ser centrifugados.

Este setor é equipado pelo AutoMate 2550, um equipamento capaz de simplificar os processos pré e pós analíticos, possibilitando acomodar maior fluxo de trabalho e eliminando erros com o preparo manual de alíquota. É capaz de destampar amostras analisando a cor da tampa e volume. Separa alíquotas para serem armazenadas no congelador (soroteca) indicando numeração e localização na rack.

É muito importante manter um fluxo contínuo e organizado neste setor, para que nenhuma amostra seja perdida ou colocada no sítio errado, causando transtornos como repetição de coleta em caso de desvio da amostra e atrasando resultados.

Durante o serviço, a maior parte das amostras que os funcionários são responsáveis por separar são: tubos com anticoagulante EDTA (tampa roxa) para a hematologia e imunohematologia, tubos com ativador de coágulo e gel separador do soro (tampa amarela) para a bioquímica, tubos com anticoagulante citrato de sódio (tampa azul) para o setor de coagulação e tubos com anticoagulante heparina (tampa verde) para determinação de metais pesados e outras análises especiais. Também armazenam algumas amostras congeladas para a imunologia pois, as análises desse setor são feitas de acordo com os dias da semana. Utilizam o AutoMate para aliquotar e separar determinados tipos de análises como pesquisa de alérgenos, que precisam depois ir para a soroteca. Para isso, utilizam congeladores que têm capacidade para armazená-las por aproximadamente 5 meses, dependendo do fluxo do laboratório.

A localização exata das amostras no congelador é indicada pelo sistema, de maneira a ser localizada facilmente se necessário. Como os setores trabalham todos com o mesmo sistema informático, toda entrada de amostra e transporte de um setor para o outro, e eventual armazenamento, é registrada.

3. Hematologia

O setor de hematologia é composto por 8 equipamentos Sysmex-XN-10® interligados que realizam o hemograma das amostras de maneira automatizada através da técnica de citometria de fluxo com fluorescência utilizando um laser semiconductor e foco hidrodinâmico. Essa tecnologia garante sensibilidade na diferenciação das células sanguíneas, além de uma contagem precisa de leucócitos, eritrócitos e plaquetas, permitindo ainda identificar padrões de células anormais. Utiliza a dispersão lateral de luz para indicar a complexidade celular, a dispersão frontal que indica o volume celular e a

fluorescência que revela a relação núcleo e citoplasma e permite diferenciar as classes leucocitárias.

Esses equipamentos estão todos conectados de maneira a manter um fluxo contínuo e rápido de análises. Cada hemograma demora em média 30 segundos para ser realizado, e o setor analisa diariamente por volta de 4000 mil amostras de sangue com EDTA. É realizado diariamente o controle de qualidade de cada equipamento, utilizando 3 níveis de controle. Um destes equipamentos é responsável pela leitura e contagem dos reticulócitos, em casos de hemoglobina baixa, e também plaquetas por fluorescência. Algumas amostras de EDTA estão acompanhadas de um tubo de citrato, pois são de doentes que já apresentaram agregação plaquetária em anticoagulante EDTA, com valores muito baixos de plaquetas ($<150 \times 10^9/L$), portanto utiliza-se o tubo com citrato para fazer fluorescência das plaquetas. Nem sempre esse mecanismo resulta em diminuir a agregação plaquetária. Uma colheita difícil ou uma gravidez também pode significar diminuição no número de plaquetas, por isso é importante avaliar o histórico do utente e, na lâmina, examinar a possibilidade de o valor baixo ser em decorrer dos agregados plaquetários.

O setor também conta com um equipamento Sysmex-TS-10®, que funciona como um sorter. De extrema importância para manter o fluxo de trabalho, todos os tubos do setor entram pelo Sysmex-XN-10® e devem passar por este aparelho, e é ele que, associado ao sistema informático, indica se aquele tubo já pode ser armazenado, ou qual o próximo teste a ser realizado, e em caso de erros no hemograma, se é necessário aquecer a amostra, verificar possível coágulo, homogeneizar ou verificar a etiqueta de identificação.

Caso o sorter indique que o tubo precisa de realizar análise de HbA1c (hemoglobina glicada), manualmente, é transferido para um dos 6 equipamentos Premier Hb9210 Trinity Biotech®, que utiliza o método de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Também é realizada a calibração e controle diário destes equipamentos, com 2 níveis de controle. Realizam cerca de 1500 amostras por dia. A coluna de HPLC presente em cada equipamento, é descalibrada ao longo do dia, com a leitura de amostras. Por norma do laboratório, foi estabelecido que após a leitura de 50 amostras, é feito novamente o controle do equipamento para garantir correta precisão e exatidão dos resultados.

Outro exame comumente realizado neste setor é a velocidade de hemossedimentação (VS), que pode ser feita através de um dos 4 equipamentos Cube 30 Touch® Vytra. O equipamento homogeneiza a amostra e faz a leitura da velocidade de hemossedimentação através de um feixe de luz. O seu controle também é diário, feito a partir do preparo de amostras sintéticas. Este é um teste que tem função de auxiliar um diagnóstico, levando em consideração que se pode obter resultados fora do padrão de referência por diversos motivos. É considerada a proporção de eritrócitos e plasma, no

volume de sangue total e o valor de referência para VS deve ser <20mm/h. Valores maiores podem indicar aumento de certas proteínas plasmáticas no sangue, no caso de doenças inflamatórias, como fibrinogênio e gama-globulina.

Após a realização das análises necessárias para cada tubo, todos retornam para o sorter para serem armazenados. Amostras onde o sistema já identificou como não patológicas, não precisam de exames adicionais e já geram um boletim automaticamente. As amostras possivelmente patológicas seguem na linha do sorter, até o próximo equipamento, que é responsável por fazer lâminas. Utilizando a combinação de



Figura 1- Ilustração de um esfregaço sanguíneo
Fonte: <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>

corante ácido (eosina) e corante básico (azul de metileno) é feita a lâmina (**Figura 1**) em cerca de 25 minutos, que é o tempo necessário para corar e fixar o esfregaço, em seguida. manualmente as técnicas do setor as transferem para o equipamento Cellavision DM9600®, que é capaz de ler a lâmina, distinguir os eritrócitos e leucócitos, realizar uma contagem das células e fotografar em alta qualidade, para que as doutoras possam fazer a validação do caso, posteriormente.

Os valores obtidos nas calibrações e controles dos equipamentos devem ser registados num programa chamado Unity Real Time. Esse registo garante que o procedimento foi realizado, além de acompanhar os resultados ao longo do tempo e facilitar a visualização de alguma anormalidade, sempre visando obter, no final, um resultado seguro e confiável.

Durante a realização do hemograma, um resultado de CHCM >36,5 g/dL é sinalizado como alterado e o sorter indica a necessidade de aquecer o tubo para confirmar o resultado. Um valor mais alto pode indicar presença de crioglobulinas (anticorpos frios aglutinados), valor de triglicérides altos (amostra muito leitosa) e pode ocorrer também com utentes queimados.

Existe uma análise específica para crioglobulinas que é feita no laboratório, entretanto hoje em dia não existem muitos pedidos. Ela utiliza uma amostra de sangue num tubo com gel separador, e é colhido soro por meio de 2 tubos capilares de vidro. Um dos tubos fica no congelador e outro em estufa a 37°C durante 24h. Após esse período, ambos os tubos são comparados, caso o tubo que permaneceu no congelador tenha aspecto floculado, é indicativo de resultado positivo para presença de crioglobulinas.

A parte técnica também é responsável por realizar a validação das amostras de HbA1c que o sistema informático identifica como incoerente. Alguns desses casos podem ser presença de valor normal de hemoglobina glicada (4,7-5,6%) e históricos anteriores

com valores mais altos, indicando que o paciente é diabético. É preciso avaliar o histórico, além de exames de glicose e urina do paciente, e repetir a análise com novas calibrações do equipamento. Também é preciso ficar atento ao utente sem histórico de diabetes que apresenta valores altos de hemoglobina glicada.

Além dos testes habituais de um setor de hematologia, as técnicas também são responsáveis por realizar o teste de pesquisa de drogas na urina ocasional, espermograma e teste respiratório de *Helicobacter pylori*.

A pesquisa de drogas utiliza urina ocasional do paciente e um teste cromatográfico que procura presença de cannabis, cocaína, opióides/morfina. Normalmente são requisições da medicina do trabalho em determinadas empresas, e o resultado do paciente só pode ser divulgado se o utente tiver assinado um termo de consentimento. Todos os testes com resultado positivo e duvidoso, a amostra segue para o setor de bioquímica especial para a realização de um teste com HPLC para identificar o composto exato. Caso confirmado, as amostras de urina devem ser armazenadas congeladas durante o período de 1 ano.

O espermograma avalia a função produtora do testículo e a esterilidade masculina, muitas vezes utilizado para confirmar o sucesso numa operação de vasectomia, onde não devem ser encontrados espermatozóides no esperma. É medido volume, pH com fita indicadora de pH, avalia cheiro, cor, viscosidade e feito o exame a fresco no microscópio. Caso seja necessário diluir, é utilizado soro fisiológico. Avalia-se a motilidade (progressivos rápidos, progressivos lentos, *in situ*, imóveis), vitalidade (utilizando corante eosinófilo que consegue entrar no citoplasma dos espermatozóides mortos), morfologia (normais, defeito na cabeça, defeito na peça intermediária, defeito na cauda) e a concentração (em câmara de Neubauer).

O teste respiratório com ureia marcada com carbono-14 avalia a presença ou ausência da bactéria *Helicobacter pylori* na mucosa do estômago do utente utilizando o aparelho Heliprobe®. A amostra é colhida em uma das unidades da Unilabs, e chega no laboratório apenas a saqueta com o cartão de coleta. Uma infecção desta bactéria pode ser a causa de úlceras, gastrite e cancro de estômago. O utente deve ingerir uma dose oral de ureia marcada com carbono-14, que é hidrolisada na presença da bactéria. Este carbono marcado é eliminado na respiração junto com o CO₂ e o Heliprobe™ é capaz de realizar a contagem de carbono reativo. O resultado pode ir de 0 (negativo) a 2 (positivo e deve ser repetido).

3.1 Validação

A validação do setor de hematologia é de responsabilidade de duas doutoras. Seu trabalho consiste principalmente em validar todas as lâminas que foram automaticamente enviadas para o Cellavision DM9600®, onde, com o auxílio do programa informático, existe uma divisão entre casos sinalizados como urgentes, urgências hospitalares (normalmente pré ou pós cirurgias) e resultados críticos (com valores muito alterados de acordo com as normas estabelecidas pelo laboratório). Além disso, contam com uma lista de casos a ponderar, em que os resultados do hemograma não estão normais, porém sem alterações suficientes que indicam a necessidade de se fazer uma lâmina. Nestes casos, é avaliado o gráfico do hemograma e de dispersão leucocitária, histórico do paciente (se houver) e os resultados do hemograma. Caso as doutoras julguem necessário mais informações, pedem para que as técnicas recuperem a amostra e façam a lâmina, que ainda é a melhor maneira de observar as alterações qualitativas e quantitativas do sangue.

3.1.1 Índices eritrocitários

Os índices eritrocitários são a base pelo qual se guia a validação do hemograma. Eles são calculados automaticamente pelo equipamento de acordo com fórmulas e parâmetros capazes de determinar a quantidade de hemoglobina, o hematócrito (percentual/volume dos eritrócitos), contagem de glóbulos vermelhos, volume corpuscular médio (VCM) de cada eritrócito (importante para determinar anemias microcíticas, macrocíticas e normocíticas), hemoglobina corpuscular média (HCM) de cada eritrócito (permite a determinação de anemias hipocrômicas, hipercromias e normocrômicas), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) que indica a quantidade de hemoglobina média percentual que está contida em cada eritrócito e a dispersão do volume eritrocitário (RDW) que permite avaliar a anisocitose. Os valores de referência utilizados pelo laboratório estão descritos no **Anexo 2**.

Aspectos importantes que são observados nos resultados do hemograma e nas lâminas, em relação aos eritrócitos, são alterações na sua forma (poiquilocitose) e no seu tamanho (anisocitose), podendo ser inferior (microcítico) ou superior (macrocítico) ao normal. Uma morfologia anormal do eritrócito pode contribuir para a diminuição no seu tempo de vida e conseqüentemente afetar o transporte de oxigênio e dióxido de carbono. Outro aspecto importante é a coloração do interior da hemácia que muitas vezes está relacionada à concentração ou produção de hemoglobina, onde a redução na concentração da hemoglobina exibe eritrócitos com maior palidez central (hipocromia) ou maior concentração, com eritrócitos mais corados (hipercromia). A policromasia é o termo utilizado para descrever uma coloração rosa/azulada de eritrócitos imaturos, que também indicam reticulócitos jovens. Adquirem essa cor pois, essas células ainda possuem RNA

ribossômico e absorvem os corantes básicos utilizados no preparo da lâmina. A anisocromia é o termo utilizado para lâminas em que a coloração dos eritrócitos difere muito entre normocrômicos, hiperocrômicos ou hipocrômicos.

Uma patologia comumente encontrada ao realizar a validação das lâminas é a anemia, que pode ser: microcítica e hipocrômica (VCM <80 fl e HCM <27 pg), sendo a principal causa a deficiência de ferro; normocítica e normocrômica (VCM e HCM dentro do valor de referência), que pode indicar anemia hemolítica; macrocítica (VCM >95fl) podendo ser megaloblástica em deficiência de vitamina B12 e ácido fólico, ou não megaloblástica, que pode ser resultado de abuso de álcool, fármacos ou hepatopatias [1]. É importante observar se há presença de

neutrófilos hipersegmentados na lâmina, pois também são uma característica da anemia megaloblástica, além do histórico clínico. Caso seja um exame de acompanhamento, o médico já deve ter indicado a suplementação de vitamina B2 e ácido fólico nestes casos.

Em casos de hemoglobina baixa com ausência de anisocitose ou outras características relevantes, o médico deve avaliar a causa da anemia, além de requerer exames para avaliar o ferro sérico, ferritina e a transferrina. Casos com a hemoglobina muito abaixo do valor de referência (<5 g/dL) e

determinado como crítico pelo laboratório, sem histórico prévio, a indicação é comunicar o utente no mesmo dia e aconselhá-lo a procurar um médico ou auxílio hospitalar. Neste caso a doutora envia um e-mail para a receção e eles devem contactar o utente um quanto antes.

Algumas alterações na forma dos eritrócitos podem ser gerais ou então específicas de determinadas patologias. Elas podem aparecer como esferócitos, eliptócitos, células em alvo (comum em deficiência de ferro), dacriócitos, falciforme (comum na anemia falciforme), estomatócitos (pode indicar hepatopia) e equinócitos. **(Figura 2)**

Size variation	Hemoglobin distribution	Shape variation	
Normal	Hypochromia 1+	Target cell	Acanthocyte
Microcyte	2+	Spherocyte	Helmet cell (fragmented cell)
Macrocyte	3+	Ovalocyte	Schistocyte (fragmented cell)
Oval macrocyte	4+	Stomatocyte	Tear drop
Hypochromic macrocyte	Polychromasia (Reticulocyte)	Sickle cell	Burr cell

Figura 2 Alterações na forma eritrocitária
 Fonte: K T N, Prasad K, Singh BMK. Analysis of red blood cells from peripheral blood smear images for anemia detection: a methodological review. Med Biol Eng Comput. 2022;60(9):2445-2462. doi:10.1007/s11517-022-02614-z

Quando o período da colheita da amostra de sangue total em EDTA demora mais do que o devido no transporte até o laboratório para a análise, normalmente o gráfico do hemograma obtido tem uma aparência anormal e as células na lâmina ficam com aspecto destruído. Nestes casos é necessário pedir uma nova colheita.

3.1.2 Leucograma

Além dos índices eritrocitários, o leucograma também faz parte do hemograma e é essencial para a análise completa do exame de sangue do utente. O sistema automatizado do equipamento permite a identificação e contagem dos leucócitos, que são parte importante da defesa do organismo agindo contra substâncias estranhas e/ou potencialmente nocivas ao sistema imunológico. Essas células se diferenciam em granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos). Apesar dos monócitos e linfócitos poderem ser chamados de agranulócitos, algumas vezes essas células possuem grânulos inespecíficos denominados basófilos, que são muito pequenos e possuem coloração azulada. A presença ou ausência de grânulos visíveis é uma característica importante que auxilia na identificação dessas células e alterações em sua forma ou número podem estar associadas a patologias.

O aumento no número dos leucócitos, em relação ao valor de referência, é denominado leucocitose, onde o equipamento envia um sinal de alerta e a lâmina deve ser avaliada. Esse aumento pode estar relacionado a uma leucemia, que pode ser mielóide ou linfocítica, e aguda (aumento de células predominantemente imaturas e indiferenciadas) ou crônica (aumento de células maduras). A diminuição no número de leucócitos, ou leucopenia, também emite um alerta e é importante observar se a leucopenia está acompanhada de uma citopenia de outras células sanguíneas, que pode indicar uma patologia na medula óssea.

Os neutrófilos contêm um núcleo polilobulado (3 a 5 lóbulos) e grânulos citoplasmáticos específicos em um citoplasma acidófilo abundante. Estão ligados a defesa primária do organismo e, processos inflamatórios, realizam a fagocitose e seu aumento é identificado em infecções bacterianas agudas e crônicas, entre outros.

Os basófilos estão geralmente associados a reações alérgicas ou inflamação prolongada como asma, rinite ou urticária. São células com núcleo lobulado, mas de difícil visualização pois possuem uma cromatina densa, além de conterem muitos grânulos que podem liberar histamina e heparina no combate a uma alergia.

Os eosinófilos também estão presentes em reações alérgicas e principalmente durante infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas. Possuem dois lóbulos no seu núcleo,

cromatina densa e citoplasma eosinófilo. São mais facilmente identificados devido a coloração rosa escura, quase alaranjada.

Os linfócitos são os menores dos leucócitos, com núcleo redondo ou oval que ocupa quase toda a célula, e cromatina densa. Seu citoplasma é basófilo e pode ou não conter grânulos azurófilos muito pequenos. Existem 3 tipos de diferenciação dos linfócitos, que varia de acordo com a sua função no sistema imune: linfócito T (auxiliares ou citotóxicos, defendendo o organismo quando suas próprias células de defesa estão afetadas); linfócito B (se diferenciam em plasmócitos e atuam diretamente contra antígenos estranhos); linfócitos NK ou *Natural Killer* (fazem parte da imunidade inata). O aumento dos linfócitos é observado em infecções bacterianas e principalmente virais. Os monócitos, em

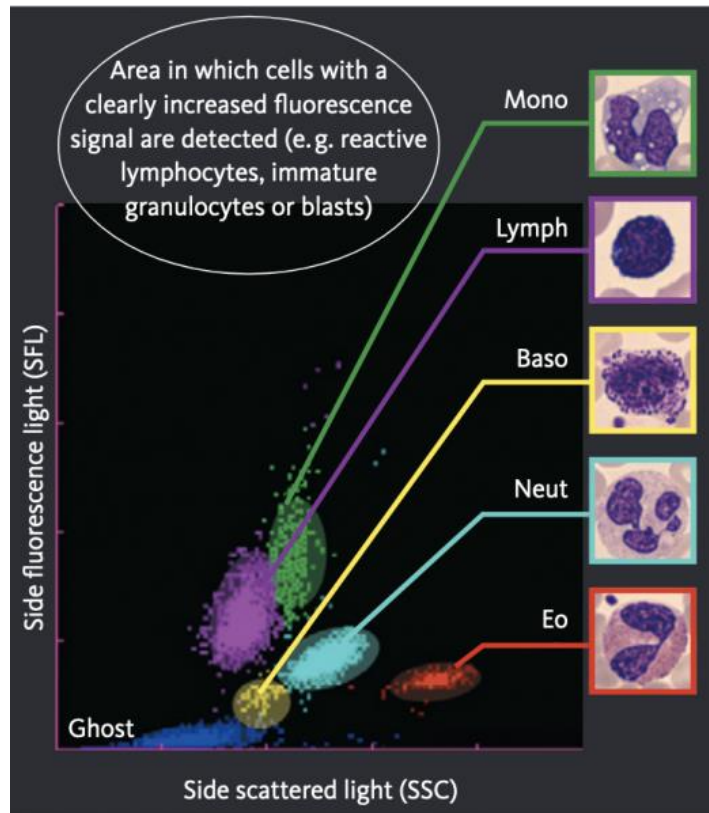


Figura 3- Gráfico de Dispersão Leucocitária indicando Monócitos, Linfócitos, Basófilos, Neutrófilos e Eosinófilos. Tamanho celular (SFL) x Complexidade celular (SSC)
Fonte: <https://bioanalise.com/2021/10/scattergram/>

contraponto aos linfócitos, são os maiores tipos de leucócitos. Com um núcleo variável entre oval, reniforme ou lobulado, costumam possuir citoplasma abundante, com ou sem granulações azurófilas e com o diferencial de possuírem ou não, vacúolos. Permanecem pouco tempo na circulação sanguínea, pois seguem para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos com função fagocítica. O seu aumento pode estar ligado a infecções crônicas, tuberculose, artrite reumatoide e carcinomas.

Além das imagens das lâminas disponibilizadas pelo Cellavision DM9600™, na validação, o gráfico de dispersão leucocitária gerado automaticamente pelo sistema ao finalizar o hemograma, é útil na identificação, classificação e interpretação de células. **(Figura 3)** O gráfico é gerado com a técnica de citometria de fluxo, que permite a separação das células por nuvens, de acordo com seu tamanho e complexidade celular. Essa complexidade se entende pela presença de granulações citoplasmáticas ou multilobulação de núcleos. Cada ponto no gráfico representa uma célula, e o aglomerado de células forma uma nuvem, de colorações diferentes. Portanto, as células menores e menos complexas,

como linfócitos, encontram-se do lado esquerdo, até as células mais complexas, e maiores, como os eosinófilos, estão do lado direito.

A presença de linfócitos reativos é um indicativo de mononucleose infecciosa ou uma infecção vírica, e podem ser identificados pelo gráfico com um prolongamento anormal (para cima e para a direita) na nuvem dos linfócitos. Isso acontece, pois, essas células são maiores (razão núcleo-citoplasma elevada), com formatos irregulares e um citoplasma mais basófilo do que um linfócito normal. Em amostras de exames de sangue de bebês, é comum aparecerem linfócitos reativos. O sistema imunitário de recém-nascidos ainda está em desenvolvimento e o aparecimento destes linfócitos nem sempre significa uma patologia. A hiperbasofilia citoplasmática é uma característica de imaturidade celular.

Uma patologia observada durante o estágio através do acompanhamento do trabalho de validação das doutoras foi a leucemia linfocítica crônica, que se caracteriza pela ausência de células jovens, grande número de linfócitos (com leucocitose) e presença de linfócitos destruídos. Esses linfócitos acabam por ter a membrana celular muito frágil e são destruídos ao realizar o esfregaço na lâmina, formando manchas que são chamadas de Mancha de Gumprecht. **(Figura 4)** Linfócitos com prolongamentos citoplasmáticos ou também chamadas de “hairy cell”, também podem ser um indicativo de um subtipo de leucemia linfocítica crônica.

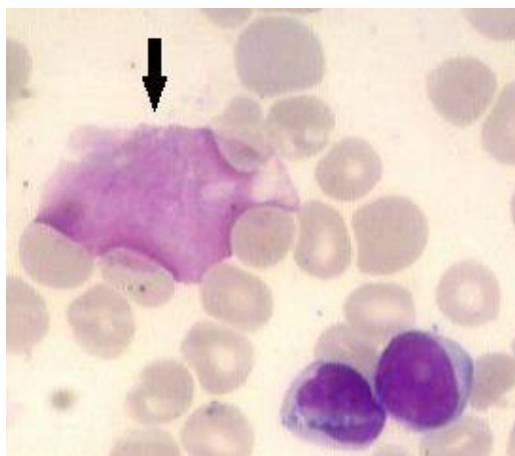


Figura 4- Mancha de Gumprecht assinalado com flecha e linfócitos
Fonte: <https://hematologia.farmacia.ufg.br/p/7144-manchas-de-gumprecht>

Células destruídas também podem aparecer em casos de colheita difícil, ou pacientes mais idosos e nestes casos é preciso avaliar o leucograma. Se não apresentar linfocitose não se trata de Mancha de Gumprecht, e necessário ter atenção aos grânulos, que podem identificar neutrófilos destruídos.

A presença de linfócitos com citoplasma clivado é um importante indicativo de neoplasia, e a indicação após identificar estas células é de realizar a imunofenotipagem, uma técnica que permite identificar qual o tipo exato de célula na amostra, permitindo dar continuidade com um tratamento apropriado.

Muitos blastos na lâmina, causando um prolongamento na nuvem de dispersão dos monócitos é um indicativo de displasia que pode ser diagnosticada como síndrome mieloproliferativa aguda. É um distúrbio no qual as células-tronco da medula óssea crescem e se reproduzem de maneira anormal, gerando muitas células imaturas.

Em relação aos granulócitos, o exame de algumas mulheres grávidas pode apresentar células imaturas, devido ao aumento natural na produção de neutrófilos que é exigido do corpo, ao gerar um bebé. É importante avaliar outros testes que possam confirmar a possível gravidez antes de se considerar uma patologia. Além disso, o sistema informático também realiza a contagem desses granulócitos imaturos, e caso a percentagem seja <3%, não é necessário realizar um esfregaço, caso seja >3% a lâmina é aconselhável para uma análise mais detalhada das células.

3.1.3 Análise do esfregaço sanguíneo

Durante o período de validação no setor de hematologia, a aluna teve oportunidade de analisar sozinha muitas lâminas já coradas, enviadas pelo NEQAS (National External Quality Assessment Site), uma organização independente sem fins lucrativos do Reino Unido, responsável por realizar uma avaliação externa/controle externo de laboratórios em diferentes países, a fim de manter padrões de qualidade objetivos e mensuráveis.

Foi possível identificar parasitas do sangue periférico como o *Trypanossoma*, filária e o *Plasmodium falciparum*, além de poder reconhecer manchas de Gumprecht, anisocitose, blastos, células em alvo, eritroblastos, policromasia, plaquetas gigantes e outras características observadas nas lâminas dos utentes durante o estágio.

4. Bioquímica (CORE)

O setor de bioquímica é o maior setor em relação ao espaço físico utilizado do laboratório. Isso acontece pois, ao receber em média 5 mil amostras por dia e uma média de 10 mil parâmetros analisados por linha de serviço, é preciso possuir equipamentos e técnicos suficientes para o processamento rápido e eficiente da bioquímica automatizada, análises de coagulação e imunoensaios. O facto de abranger outras especialidades além da bioquímica básica faz com que o setor também seja chamado de CORE. O soro/plasma é a porção do sangue periférico mais utilizada para as análises nessas especialidades, mas também são analisadas urinas de rotina, para obter valores de ácido úrico, ureia creatinina, cálcio, fósforo, magnésio, proteínas, microalbuminúria e glicose.

Referente à bioquímica e imunoquímica, que inclui análises como glicose, colesterol, triglicerídeos e também serologia de doenças infecciosas e vitaminas, os parâmetros são todos analisados por um sistema interligado e automatizado que conta com 5 equipamentos Atellica® CH 930 Analyzer (Siemens) e 4 equipamentos Atellica® IM Analyzer (Siemens) além de 3 Atellica® Sample Handler (**Figura 5**) que organizam e manuseiam amostras e controles de qualidade, decapador e selante de tubos, e o Storage.

O setor é munido de 2 equipamentos que servem para armazenamento dos soros em tubos selados, chamados Storage. Cada um tem a capacidade de 15 mil amostras, e realiza o descarte automaticamente, de maneira a sempre garantir espaço para armazenar novas amostras. As urinas são armazenadas por apenas 24h e depois descartadas.

Os equipamentos CH são responsáveis pelas análises químicas e as técnicas utilizadas fotometria, turbidimetria, quimiluminescência e eletrodos íon-seletivos. Os IM realizam imunoensaios através da técnica de quimiluminescência. O setor conta com 3 linhas de serviço onde estes equipamentos estão distribuídos e diferem apenas em relação a análise de alguns parâmetros específicos, como a pesquisa de doenças virais que só é feita na linha 3. Parâmetros como glicose, albumina, bilirrubina, colesterol e triglicerídeos, são analisados em

qualquer uma das linhas. Isso garante com que, mesmo se alguma linha não estiver funcional, outras possam realizar as análises mais habituais. Os equipamentos



Figura 5- Linha contendo Atellica® Sample Handler, Atellica® CH e Atellica® IM.
Fonte: <https://www.siemens-healthineers.com/en-us/integrated-chemistry/systems/atellica-solution-analyzers>

Sample Handler

distribuem as amostras de maneira a que todos os equipamentos estejam sempre a funcionar da maneira mais eficiente. O seu funcionamento depende do sistema informático em que está programado e da integração entre as máquinas, para ditar em qual das linhas a amostra deve ir e qual equipamento está equipado com testes e controlos adequados para as devidas análises que devem ser realizadas.

Diariamente, são programadas manutenções dos equipamentos e controlos de qualidade de cada parâmetro, que são feitos antes do início do turno dos técnicos, e abertura do laboratório. Semanalmente também é feita limpeza das sondas e verificações manuais. Para a manutenção é importante garantir que o equipamento possui os consumíveis necessários. Ao iniciar o trabalho, os técnicos verificam se o que havia sido programado foi devidamente concluído.

Para análises eficientes, a linha totalmente automatizada deve ser mantida com uma rigorosa gerência, para que nenhum reagente, controlo ou calibrador seja desperdiçado, nenhuma amostra seja perdida, e para que os resultados sejam precisos e confiáveis. São efetuadas calibrações de um parâmetro sempre que se utilize um novo lote de reagente, quando expirar a calibração (cada teste possui um período de validade) e

quando um controlo fica fora do desvio padrão. Diariamente, logo pela manhã é verificado se algum reagente está com a calibração para expirar (ideal nunca deixar expirar) ou chegando ao fim do seu volume (substituir por um novo lote) e, caso seja preciso, é sempre feita primeiro a calibração do parâmetro e em seguida o controlo do reagente.

Para a análise de urinas, utiliza-se os mesmos reagentes dos soros, exceto para a microalbuminúria e proteínas, pois os valores de referência são diferentes e a calibração do parâmetro também deve ser. Todos os dias, o equipamento já tem programado a necessidade de efetuar dois controlos diferentes para estes parâmetros, na urina e no soro.

Os controlos de qualidade garantem que os reagentes utilizados confirmam resultados dos parâmetros dentro do desvio padrão esperado, valores estes determinados pela calibração. Os controlos ficam armazenados dentro do Sample Handler e são devidamente agitados e refrigerados automaticamente. Os calibradores permanecem guardados no congelador e só são retirados quando necessário realizar a calibração.

Alguns parâmetros possuem 3 níveis de controlo, numa análise quantitativa, sendo um nível “normal”, um patológico alto e um baixo. Isso acontece pois, os seus valores podem ser muito baixos no soro, e esses níveis aumentam a sensibilidade do teste. Já outras análises são semiquantitativas como HIV, e o valor obtido só pode indicar um resultado positivo ou negativo. Incoerências podem exigir uma recalibração.

Os resultados, tanto da calibração quanto dos controlos, são registados pelo programa Unity Real Time e analisados através de gráficos. Os controlos são “cegos”, ou seja, não se sabe o valor exato, e deve variar entre os lotes. Portanto, conforme o lote é utilizado é possível obter uma média. Aqueles resultados que estiverem fora do desvio padrão máximo, devem ser repetidos.

O controle de qualidade externo é feito pelo RIQAS (randox International Quality Assessment Scheme), uma organização que permite comparar a performance analítica de diversos laboratórios que utilizam os mesmos métodos e equipamentos para realizar suas análises. Isso permite uma normalização das técnicas de diagnóstico ao medir a precisão de um teste utilizando amostras “cegas” que são analisadas como amostras de utentes. Os resultados enviados pelos laboratórios participantes ao redor do mundo, são submetidos a uma análise estatística e após a análise, cada laboratório pode comparar o seu desempenho individual. Só se pode acreditar num parâmetro se o mesmo possui um controle externo. O laboratório recebe amostras do RIQAS uma vez ao mês.

4.1 Validação

A validação é de responsabilidade de duas doutoras, uma delas é encarregada de validar a porção dos imunoensaios e outra, a parte química, além de supervisionar os

resultados de todos os parâmetros. De acordo com as regras estabelecidas pelo laboratório respeitando também as regulamentações, o valor obtido no resultado de uma análise que for muito próximo ao resultado anterior, considerando o histórico do paciente e valores de referência, é validado automaticamente pelo sistema.

Antes de analisar uma amostra, o equipamento é capaz de determinar o parâmetro de hemólise, lipemia e icterícia da mesma. Durante a validação esses resultados também são considerados e podem ajudar a justificar algum resultado fora dos valores de referência. Dependendo do parâmetro que está sendo analisado é necessário pedir uma repetição de coleta. No caso de presença de hemólise, deve-se tomar cuidado com resultados de albumina, fosfatase alcalina, AST (aspartato aminotransferase), creatinina, ferro e potássio, por exemplo, e, nas amostras lipêmicas, é importante ficar atento aos resultados de amônia, colesterol e triglicerídeos.

O sistema informático é capaz de interligar os resultados dos controles internos assim como as médias dos controles externos, para fornecer o resultado correto de cada parâmetro, no boletim.

Durante o estágio foi possível observar a validação durante um curto período de tempo, porém algumas análises estudadas durante as aulas, se mostraram presentes, como PSA (antígeno prostático específico), onde uma razão pequena entre o valor livre e o valor total indica uma possibilidade pequena de existência de cancro de próstata; procalcitonina, um biomarcador inflamatório e precursor do hormônio calcitonina, que auxilia no diagnóstico diferencial de sépsis, pois está presente na circulação sanguínea no caso de infecções bacterianas; PTGO (prova de tolerância à glicose oral) utilizada para diagnóstico de diabetes (2 amostras para utentes não grávidos) e 3 amostras para utentes grávidas; teste de supressão do cortisol com dexametasona (pode diagnosticar Síndrome de Cushing); titulações de VDRL (estudo laboratorial de doenças venéreas) utilizadas no diagnóstico de sífilis pelo setor de análises especiais; teste de quantificação do lítio presente em alguns medicamentos antidepressivos, importante para verificar se está dentro da faixa terapêutica e ajuste de dose.

4.2 Imunoensaios

Durante o período no CORE, a aluna esteve durante uma semana observando e auxiliando na rotina de alguns imunoensaios específicos, onde alguns exames fazem parte da cadeia automatizada (IM Analyser), e outros são realizados por equipamentos fora da cadeia. Nem todas as análises são feitas diariamente, existe um cronograma semanal confeccionado pelo laboratório, que determina quais os dias para cada análise específica, de maneira a facilitar o serviço e evitar desperdícios de tempo e reagentes. Enquanto

esperam para ser analisadas, as amostras ficam congeladas. Os ensinamentos do estágio foram dados de acordo com cada equipamento do setor, o seu funcionamento e os parâmetros analisados.

4.2.1 IMMULITE® 2000 XPi Immunoassay System (Siemens)

O equipamento opera de maneira parecida ao IM Analyser, porém utiliza reagentes diferentes para algumas análises mais específicas. Usa esferas de poliestireno revestidas com anticorpo ou antígeno específicos, que capturam e doseiam o analito de interesse. Executa imunoensaios quimiluminescentes a partir de amostras de soro, plasma, fluido amniótico ou urina.

Tem capacidade para 24 cartuchos de reagentes, **(Figura 6)** que devem ser calibrados e controlados conforme o uso. São identificados através do código de barras e contém um conjugado enzimático específico para cada ensaio.

O equipamento é capaz de analisar 23 analitos diferentes, e eles são: gastrina (hormona gastrointestinal que estimula a secreção de ácidos gástricos); cortisol; tiroglobulina (pró hormona sintetizada nas células foliculares da tireoide); androstenediona (precursora da testosterona e da estrona); ACTH (hormona adrenocorticotrófica); CMV IgM e IgG (citomegalovírus); HCG (gonadotrofina humana), hGH (hormona do crescimento); β -2 micro globulina (indicador de disfunção tubular); TBG (globulina de ligação à tiroxina); β HCG livre (para rastreio pré-natal); VCA IgM, VCA IgG e EBNA IgG (vírus Epstein-Barr ou herpes vírus); IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina); Eritropoetina (principal regulador da eritropoiese); Calcitonina (regulação de cálcio e fósforo); IGFBP-3 (fatores de crescimento); PAP (fosfatase ácida prostática); Peptídeo-C (utilizado para avaliar a produção endógena de insulina); DHEA-SO₄ (esteroide adrenal); SHBG (globulina de transporte de hormonas sexuais).

Amostras de herpes IgM e IgG e de HIV positivas ou duvidosas (pelo IM Analyser), realizadas pelo método de quimiluminescência, sempre devem ser repetidas pelo método de fluorescência através do equipamento VIDAS® (bioMérieux).



Figura 6- Colocação de um cartucho de reagente no equipamento IMMULITE 2000 XPi Fonte: <https://nacce.siemens-info.com/>

4.2.2 VIDAS® (bioMérieux)

Este equipamento utiliza a tecnologia ELFA (enzyme linked fluorescent assay), onde a enzima utilizada é a fosfatase alcalina, que catalisa a reação de hidrólise do substrato e emite uma fluorescência. É muito utilizado como metodologia alternativa e/ou confirmatória e para sorologia infecciosa.

As análises realizadas pelo equipamento VIDAS® são: CMV IgG avidez (citomegalovírus); doseamento de IgM e IgG CMV; avidez Toxoplasmose; doseamento de IgM e IgG da Toxoplasmose (para determinar estado imunitário); D-dímero (produtos de degradação da fibrina, diagnóstico de tromboembolismo); anti-HCV (deteta anticorpos contra vírus da hepatite C); antígeno e anticorpo anti-HBe (hepatite B); IgM e IgG anti-HEV (hepatite E) doseamento de IgM e IgG da rubéola (importante para determinar condição imunitária); HIV DUO (realiza a detecção de antígenos do HIV-1 e dos anticorpos anti-HIV-1 e HIV-2, que permite diminuir a janela sorológica para melhor diagnóstico); dosagem de HCG (determinação de gravidez); IgG anti-Lyme (borreliose de Lyme, doença infecciosa transmitida por carrapatos).

4.2.3 cobas®e411

Utilizando o método de eletroquimioluminescência (ECL), onde a aplicação de uma corrente elétrica emite uma quimioluminescência que é medida por um fotomultiplicador. É possível obter uma elevada sensibilidade analítica, onde a célula de leitura utiliza uma amplificação do sinal para detetar concentrações muito reduzidas do analito em análise.

Os parâmetros analisados no laboratório, por este aparelho, são: Troponina (proteína envolvida na contração muscular); fragmento CYFRA-1 (proteína estrutural que forma filamentos epiteliais, que funciona como marcador tumoral); CA72-4 (marcador tumoral); NSE (marcador tumoral para carcinoma pulmonar); osteocalcina (regula a maturação óssea); SCC (marcador tumoral de colo uterino); cortisol; AMH (hormona anti-Mülleriana, que avalia a reserva ovárica); HTLV-1/2 (vírus T linfotrópico, retrovírus); HE4 (proteína do epidídimo, marcador de cancro de ovário que ajuda a evitar um diagnóstico mais invasivo, além de ser utilizado juntamente com o marcador tumoral CA-125).

4.2.4 UniCel Dxl (Beckman Coulter)

Este equipamento utiliza partículas paramagnéticas ligadas a um anticorpo monoclonal, conjugado de fosfatase alcalina e uma tecnologia quimioluminescente. A luz gerada pela substância em análise ligada a fase sólida, é lida pelo luminômetro.

O UniCel é utilizado para um menor número de análises, que são: inibina (marcador endócrino que reflete a atividade folicular e pode estar alterado em gestações patológicas ou aneuploidias); PSA livre e total (ajudam a distinguir o cancro de próstata de outras doenças benignas); proPSA (antígeno específico da próstata, utilizado para diagnóstico); estriol não-conjugado (ajuda a calcular risco de anomalias cromossômicas em testes pré-natais).

4.2.5 Validação

Durante o estágio foi possível acompanhar o funcionamento dos equipamentos que realizam os imunoensaios, assim como manipulação e armazenamento das amostras e programações das análises. Além disso, foi possível acompanhar brevemente a parte final, referente a validação dos resultados para o boletim médico.

Para pesquisa de citomegalovírus, toxoplasmose e rubéola, amostras com resultado positivo para anticorpo IgG no Atellica® IM, com repetição no VIDAS® e resultado limítrofe ou negativo, deve ser feito teste de IgG avidéz se o utente se tratar de uma mulher grávida. Este teste permite verificar se trata-se de uma infecção nova ou antiga, prevenindo possíveis infecções congénitas. Quando se trata de uma infecção antiga existem menos anticorpos IgM (primeiro anticorpo liberado na reação a um agente infeccioso ou toxina), e um valor maior de IgG (anticorpo produzido na fase mais tardia da infecção) avidéz. Para uma infecção recente, existe um número maior de anticorpos IgM e portanto, uma menor produção de anticorpos IgG (baixa avidéz).

Em casos de resultado positivo para HIV, com ausência de histórico médico, a norma é que seja feita uma nova colheita para análise confirmatória que utilize outra metodologia que o teste anterior.

Com os resultados quantitativos dos marcadores tumorais HE4 e CA125 (proteínas) juntos, é possível calcular o índice ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm ou algoritmo de risco de malignidade ovariana) na pré e pós menopausa. O índice auxilia na estimativa do risco de cancro epitelial dos ovários em mulheres que apresentem uma massa pélvica ou da probabilidade de se encontrar esse tipo de cancro durante cirurgia.

As análises essenciais durante o rastreio pré-natal do 2º trimestre de gestação devem ser: fração livre do β HCG (para detecção de trissomias fetais), Estriol livre, Inibina A e alfafetoproteína (principal proteína do soro fetal e utilizada para pesquisa de alguns tipos de malformação congénita).

Seguindo as regras do laboratório para resultados positivos de HCV pelo equipamento Atellica® IM (quimiluminescência), deve ser efetuada a repetição por um método alternativo (VIDAS® - através de enzyme-linked fluorescence assay) e no caso do

resultado ser inconclusivo, é feito um teste confirmatório de imunocromatografia. Mesmo se o valor obtido no Atellica® IM seja alto suficiente para ser considerado positivo, é preciso fazer uma repetição através do VIDAS®. Ao obter resultados divergentes, deve-se levar em conta que se pode tratar de uma infecção recente, onde os anticorpos ainda estejam em desenvolvimento. Por este motivo é importante que após algumas semanas seja feita uma nova colheita e análise para que o resultado seja conforme.

4.3 Coagulação

No espaço onde se localizam a maior parte dos equipamentos responsáveis pelos imunoensaios, também é possível encontrar as duas unidades do equipamento que realizam as análises de coagulação, o Sysmex® CS-5100 (**Figura 7**). Todas as análises podem ser feitas em ambos os aparelhos, porém, ocorre uma alternância semanal entre estes: um equipamento fica reservado somente para as urgências ao longo do dia e outro o para as análises agendadas, para que não se desgaste muito a lâmpada, com o grande volume de análises). Todas as análises desse setor são feitas por amostras colhidas em tubos de tampa azul que contém o anticoagulante citrato de sódio.



Figura 7 - Equipamento Sysmex® CS-5100
Fonte: <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/cs-5100.html>

Os métodos utilizados por este equipamento, para avaliar as amostras, são: método de coagulação (avalia a mudança da turvação no processo de conversão do fibrinogênio em fibrina, medido pela intensidade da luz recebida pela fotodiodo - luz é convertida em sinal elétrico); método cromogénico (processo de emissão de cor por um substrato sintético cromogénico que altera a absorbância da luz); imunoensaio e método de agregação plaquetária (processo de reação da amostra-reagente que contém partículas capazes de agregar na presença da reação antígeno-anticorpo ou partículas com capacidade natural de agregar como plaquetas. Reação medida pela alteração da absorbância).

No método de coagulação, amostras com baixo teor de fibrinogénio devem emitir uma menor quantidade de luz. A intensidade da luz é medida através de percentagem.

Os parâmetros relacionados à coagulação, avaliados no laboratório, são: AL (anticoagulante lúpico, que são autoanticorpos contra fosfolipídios); FVW (fator de von Willebrand (pode estar associado a uma patologia hemorrágica, pois promove a fase de

adesão plaquetária); 'GPIIb (glicoproteína 'Ib); trombina (para rastreios de perturbações da formação da fibrina, avaliar presença de fibrina e de inibidores diretos); fatores de coagulação (podem ser utilizados para avaliar tempo de protrombina (TP) ou tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) prolongado, monitorar terapêutica, diagnóstico de deficiência); TTPA (monitorização de terapêutica com anticoagulante); Proteína S (dependente de vitamina K e cofator de alguns anticoagulantes naturais); heparina não fracionada e de baixo peso molecular (capaz de acelerar a inativação da trombina, funcionando como anticoagulante terapêutico); fibrinogénio (onde o tempo de coagulação do plasma é inversamente proporcional a concentração de fibrinogénio no plasma); antitrombina; bloqueio e disfunção plaquetária; proteína C (inibidor da coagulação avaliada por determinação quantitativa); tempo de tromboplastina através do reagente Thromborel (para monitorar terapêutica, deficiências genéticas e síntese hepática).

Amostras com quantidades muito inferiores ao volume necessário para o correto funcionamento do anticoagulante presente no tubo, com a amostra, invalidam o teste e não vão para o equipamento, são separados para que seja pedido nova colheita. As amostras que estão muito hemolisadas, é feita a análise e posteriormente avalia-se os resultados, sendo necessária nova colheita se estiverem muito alterados.

5. Medicina transfusional e Imunohematologia

Amostras de sangue com EDTA são a base para todas as análises realizadas neste setor. Além de incubadora, centrífugas e refrigerador, utiliza-se o equipamento Ortho AutoVue System™ (3 unidades) para a realização da maior parte das análises feitas diariamente.

Os três tipos de serviço que são executados no laboratório são: exames de rotina (identificação de grupos sanguíneos (GS), pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), coombs indireta e reversa), normalmente realizados no pré-natal de mulheres grávidas; pedidos de transfusões sanguíneas (GS, PAI, compatibilidade sanguínea) que são requisições externas de hospitais, e amostras de Bebê Vida, onde é feito GS e coombs direta. Os exames de rotina muitas vezes também estão relacionados a outros exames conduzidos no setor de hematologia e bioquímica.

Referente ao equipamento mais utilizado (Ortho AutoVue System™), é feita uma manutenção semanal com calibração, descontaminação dos fluidos e limpeza manual da máquina (com álcool), e uma manutenção diária, apenas para descontaminação das pipetas, com soro fisiológico, que é feita pelo próprio equipamento após programação manual. O controle também é feito diariamente, e utiliza uma amostra sintética de sangue,

com todas as características conhecidas. Após aberto, esta amostra pode ser utilizada durante aproximadamente 1 mês.

O setor possui um stock de bolsas com concentrado de hemácias (CH) e plasma sanguíneo rico em plaquetas (PRP) no frigorífico, que é mantido através de contato direto e frequente com o IPS (Instituto Português do Sangue). As bolsas sempre possuem identificação do tipo sanguíneo e fator Rh, além de código de barras único e específico. No frigorífico, as bolsas têm validade de 42 dias (com base no anticoagulante utilizado na bolsa de armazenamento) após coleta do dador e o plasma congelado pode ter validade de até 1 ano. O laboratório utiliza o SIBAS (Sistema Integrado de Bancos de Sangue) para gestão de stock do laboratório e rastreio de pedidos novos e passados, de forma a otimizar o serviço, conferindo os gastos mensais e evitar ao máximo perdas desnecessárias de bolsas de sangue.

As bolsas derivam do sangue total coletado do dador, que possui todos os componentes sanguíneos, tendo aproximadamente 450ml. Este sangue é fracionado, dando origem aos hemocomponentes que podem ser usados na terapia transfusional, como o CH e PRP. Ao aproximar da sua data de validade, é preciso ter atenção, pois as bolsas devem ser devolvidas até 10 dias antes de vencer, ao IPS.

Por segurança, em todas as amostras que chegam do IPS é feito teste confirmatório do GS do dador, antes de armazenar no frigorífico.

5.1 Pedidos de Transfusões Sanguíneas

Os testes de compatibilidade são feitos quando o laboratório recebe pedidos de bolsas para transfusões sanguíneas. A prova consiste em colocar em contato o soro do receptor com as células do(s) potencial(ais) dador(es), de modo a detetar no receptor anticorpos suscetíveis a destruir as células do dador. Ou seja, tem por objetivo verificar “*in vitro*” a compatibilidade eritrocitária entre o dador e o receptor.

Normalmente o hospital faz a requisição antecedendo uma cirurgia ou transfusão programada, para ter um stock de segurança (que nem sempre é utilizado), portanto a validade das bolsas enviadas é mais alargada, garantindo uma cobertura eficiente por até 3 dias. Se não forem utilizadas neste período, devem ser devolvidas ao laboratório.

Outras vezes são feitos pedidos de urgência no caso de cirurgias de emergência, sem agendamento prévio. Em ambos os casos, estes pedidos sempre possuem prioridade, e os testes e resultados devem ser realizados o mais brevemente possível, assim como o envio das bolsas de sangue compatíveis, através dos motoristas próprios do laboratório.

A requisição de transfusão acompanha uma amostra de sangue total do paciente em EDTA, colhida e enviada pelo hospital, registro de transporte e número da pulseira de requisição transfusional (único) **(Figura 8)**. É feito o registro e conferido se o



Figura 8- Exemplo de pulseira de requisição transfusional com QR code

Fonte: <https://hawadyc.com/pt-pt/pulseiras/pulseira-transfusao/>

paciente em questão já possui histórico recente de transfusão, e então é feito teste de GS e PAI. Com os resultados, é localizado um potencial doador do stock do laboratório, retirada uma amostra e repetidas as análises para paciente e doador, para avaliar compatibilidade. A base da análise de compatibilidade é a utilização de eritrócitos do doador e soro do paciente, e se são identificados anticorpos no soro, contra eritrócitos do doador, o que ocasionaria uma rejeição daquela amostra.

Sempre que o laboratório recebe novas amostras, independente se sejam de um paciente conhecido, os mesmos exames são repetidos. Os resultados destes exames duram apenas 3 dias, após este período, o paciente (caso tenha recebido uma transfusão) pode ter tido reações adversas e produzido anticorpos que alteraram seu componente sanguíneo. A pulseira de requisição transfusional utilizada pelo paciente que precisa de transfusão de plaquetas, soro ou plasma, serve para o mesmo dia e até 2 dias depois, por este motivo.

Se por acaso o doente for muito politransfundido (recebeu muitas transfusões), convém pedir duas amostras de sangue total, para salvaguardar de uma possível reação anafilática gerada após nova transfusão, pois este paciente já está muito sensibilizado. Nestes casos é importante haver mais de um doador compatível, e já executar previamente as análises de compatibilidade.

Os pedidos de transfusões são armazenados durante 30 anos, uma forma de segurança para o laboratório garantir o registro dos resultados dos exames em caso do paciente apresentar em algum momento da vida reação adversa a transfusão ou seja acometido por uma doença.

5.2 Fundamento dos testes de GS e PAI

No equipamento Ortho AutoVue System e manualmente, os testes são feitos através da metodologia em cards de gel (Ortho Clinical Diagnostics), que garante maior sensibilidade e especificidade e facilidade na leitura e interpretação dos resultados. Os cards também acompanham um kit com anticorpos e eritrócitos conhecidos.

O teste de Coombs avalia a presença de anticorpos específicos que podem se ligar ou não aos eritrócitos de um paciente. Ele pode ser direto: avaliando diretamente as células vermelhas do sangue, verificando se há auto-anticorpos ligados à superfície da hemácia e se esses anticorpos são derivados do próprio sistema imune da pessoa ou recebidos por transfusão. Esse teste normalmente é realizado para detectar doenças autoimunes como anemias hemolíticas. E o indireto: pesquisa os anticorpos presentes no soro, que podem ser adquiridos (transfusões) ou alterados. Este teste normalmente é feito para compatibilidade, na gravidez, estudo pré-transfusional. Em ambas, a aglutinação (hemácias-anticorpo-anticorpo monoclonal anti-hemoglobina humana IgG) indica positividade.

No caso da prova de GS, é feita uma tipagem direta através de uma suspensão eritrocitária, utilizando soros Anti-A e Anti-B (provenientes do Kit). Se houver aglutinação entre os eritrócitos da suspensão e ambos os soros com anticorpos, significa que aqueles eritrócitos possuem antígeno A e B em sua superfície, sendo o paciente do grupo AB. Na prova reversa procura-se anticorpos e é testado o soro do paciente com eritrócitos A1 e B1 (provenientes do Kit). O grupo do paciente sendo AB significa que não haverá aglutinação, pois o paciente não possui anticorpos A e B no soro. Ambas as provas precisam ser coerentes e o teste reverso é confirmatório para determinação do sistema ABO. O grau de aglutinação pode variar, podendo ser necessária a repetição do teste, e a classificação desses graus é determinada pelo kit indo de 0 a 4, sendo 4 o mais aglutinado.

(Figura 9)

Junto com a prova de GS, é determinado o fator RhD, que se trata de uma característica hereditária que se refere a uma proteína específica encontrada na superfície dos eritrócitos, denominada antígeno D. Ao contrário do sistema ABO, o paciente que não possui o antígeno D nos eritrócitos, também não possui o anticorpo anti-D no seu soro. Portanto, a pesquisa baseia-se apenas na utilização de anticorpo anti-D do kit e avaliação da aglutinação positiva ou negativa em caso de presença ou ausência desta proteína nos eritrócitos.

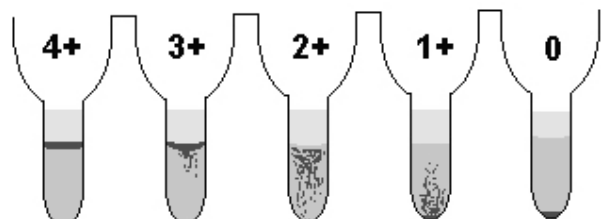


Figura 9- Ilustração de graus de aglutinação
Fonte: Vizzoni AG, da Silva FRM. Teste da Antiglobulina Humana: Uma Revisão da Literatura. Revista Eletrônica de Farmácia. 2015, v. 12, n. 3, p. 5–14. doi: 10.5216/ref.v12i3.33656. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/>

Na tipagem dos dadores, é sempre importante considerar como positivo mesmo as amostras de D fraco (grau de aglutinação). Qualquer transfusão de um paciente positivo para um paciente negativo pode gerar complicações, pois o receptor terá a tendência de produzir anticorpos (já que não os tem) contra o antígeno D. Para os receptores de

transusão, o risco de complicações é inferior se o paciente já for identificado como portador do antígeno D.

O teste para identificação do fator RhD é indireto, utilizando a amostra e anticorpo monoclonal anti-IgG. Sempre se utiliza um controle positivo (deve aglutinar). Além de feito pelo equipamento, no caso de D fraco ou negativo na tipagem sanguínea de bebês e amostras do laboratório do Bebê Vida, o teste é repetido manualmente, utilizando-se dos mesmos cards de coombs indireta.

A exposição a substâncias reconhecidas como não-próprias do organismo, como os antígenos eritrocitários, pode desencadear ativação do sistema imune com formação de anticorpos. Estes são chamados de anticorpos irregulares e podem ocorrer como resposta aos antígenos eritrocitários presentes nos hemocomponentes que são transfundidos. A PAI tem como princípio a triagem de anticorpos eritrocitários desenvolvidos no soro do receptor, pela ausência dos respectivos antígenos conhecidos do sistema sanguíneo, com a utilização de anti-globulina humana, na técnica de coombs indireto. Anticorpos estes, que podem gerar reações de rejeição após uma transfusão incompatível.

O equipamento analisa o soro do paciente com 3 células (tipadas), contendo os principais antígenos que caracterizam os anticorpos dos principais sistemas eritrocitários (Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, P, MNS, Luth e Xg). Na presença de PAI no soro do paciente, haverá aglutinação com as células eritrocitárias e essa informação deve ser levada em consideração na escolha de um dador que não possua esse antígeno nos seus eritrócitos.

No caso da PAI ser positiva pelas 3 células utilizadas no equipamento, é necessário realizar a identificação destes anticorpos irregulares. Essa identificação mais específica é sempre feita manualmente através do soro do paciente com o auxílio de cards com gel impregnado com antiglobulina humana poliespecífica (anti-igG) e 11 células eritrocitárias comerciais, de origem humana, com perfil antigénico conhecido. A ligação de alguns anticorpos pode ser potencializada com a adição de enzimas específicas.

		Rh-hr						Kell						Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth		Xg	Resultados	
		D	C	E	c	e	C ^w	K	K	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	LISS-Coombs	Enzima
1	C ^w CDDee R ₁ ^w R ₁	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+++	+++
2	CCDee R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+++	+++
3	ccDEE R ₂ R ₂	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0
4	Ccdee r'r	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	++	+++
5	ccddEe r''r	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+

Figura 10- Exemplo de parte de um Pannel de Identificação de Anticorpos Irregulares

Fonte: https://conhecimento.fgv.br/sites/default/files/concursos/prosangue_2013_ns_biolologista_tipo_01.pdf

Consoante o resultado do equipamento e o lote que está em uso, o técnico escolhe um painel (Kit comercial) de anticorpos mais apropriado. Todos os meses de acordo com o uso de cada teste, os fenótipos das células utilizados nos painéis se alteram, pois, as mesmas são sintetizadas a partir de células humanas (fenótipos exclusivos), para a construção do kit. É importante verificar caso o paciente já possui histórico de PAI positivo, pois provavelmente o fenótipo será o mesmo.

O teste tem como princípio a identificação de anticorpos eritrocitários irregulares desenvolvidos pela ausência dos respetivos antígenos correlatos dos sistemas sanguíneos pela utilização de um Painel de Identificação, constituído de várias hemácias fenotipadas e caracterizadas por diagrama com as características de cada anticorpo de importância clínica. Através do preenchimento e análise do diagrama (**Figura 10**), o anticorpo identificado deve apresentar um perfil com características similares ao soro analisado. Essa análise deve ser feita com atenção, pois é possível que uma mesma amostra apresente mais de um anticorpo irregular.

Após a identificação é necessário realizar uma titulação para determinar a concentração relativa deste anticorpo em circulação no sangue do paciente. É um método semi-quantitativo que se baseia em diluições sucessivas. O título corresponde à diluição mais alta que ainda obteve aglutinação.

As amostras de PAI positivas devem ser armazenadas congeladas na soroteca para possíveis estudos futuros ou repetições de análises.

Um paciente que por algum motivo tem a necessidade de receber transfusões sanguíneas constantes, normalmente acaba por desenvolver um perfil de PAI positivo. Para um receptor com PAI positivo, é sempre indicado o envio de CH com fator RhD negativo e ausência de PAI, a fim de não sensibilizar ainda mais o receptor. Por estes motivos, é importante a determinação de anticorpos irregulares para exames pré-transfusionais, tanto no receptor como no dador, e também em pré-natais, para identificar o perfil sorológico da mãe e se este pode indicar uma ameaça à saúde do feto ou da própria.

6. Pré-analítico de urinas e fezes

O setor pré-analítico, assim como a triagem de soros, é responsável por receber todas as amostras de urina e fezes que chegam no laboratório, e distribuí-las para os devidos setores que devem proceder com as análises que os competem.

Da parte da manhã, é conferido no sistema, caso algum setor tenha reportado falta de alguma amostra para a realização de análises. Caso não haja faltas, todas as amostras primárias de urina e fezes são descartadas. É importante que, apesar do volume de

amostras recebido diariamente, todo o serviço seja feito com muita atenção, a fim de evitar qualquer erro técnico e transtornos, e, se necessário, realizar um pedido de nova colheita.

Durante o serviço, as urinas que devem seguir para o setor de bioquímica para a realização de exames como creatinina, microalbuminúria e ácido úrico, são todas centrifugadas durante 5 minutos. As urinas sumárias tipo 2 e bacteriológicas devem ser transferidas para tubos com 10ml de amostra (ou todo o volume), e seguem para o setor de microbiologia.

Urinas de 24h são armazenadas em um contentor apropriado e contém todo o volume de urina de um período de 24 horas. É indicado principalmente para medir a função dos rins e avaliar proteínas e substâncias na urina. Todos os recipientes precisam ser homogeneizados e pesados para o cálculo do volume. O sistema informático ao fazer a leitura do código de barras indica quais são os exames que precisam ser realizados naquela amostra, e indica a quantidade de tubos que precisam ser retirados. As análises feitas no laboratório são: ácido aminolevulínico na bioquímica especial, cortisol, PCR e amostra para armazenar na vinoteca. Para algumas análises, a urina precisa de estar acidificada (pesquisa de cálcio e magnésio), ou alcalinizada (pesquisa de ácido úrico) para manter as propriedades necessárias. O pH é verificado com fita indicadora.

O setor também realiza o recebimento de amostras para análise de despiste de drogas que chegam em um envelope selado. Todas as amostras de despiste de drogas precisam de uma alíquota para a rinoteca.

Em amostras de fezes é possível realizar o teste de sangue oculto. Essa análise é feita no aparelho O-Sensor Plateia, e seu controle é feito diariamente antes do serviço. Por norma, são colhidas 3 amostras de fezes de dias diferentes e o técnico coleta um pouco de cada amostra e coloca em um tubo diluente, descartável, específico para a leitura no equipamento. Se o resultado for positivo, é feita a repicagem novamente e repete-se o teste.

É analisada também a calprotectina, uma proteína abundante no citoplasma dos neutrófilos, marcador de inflamação intestinal, como a Doença de Crohn.

Para o exame parasitológico, também é feita a repicagem de 3 amostras de fezes para um tubo de processamento (Sistema de Diagnóstico ParasiTrap®) (**Figura 11**) e adiciona-se lugol, que permite a impregnação de ovos, cistos, larvas e vermes adultos facilitando a visualização das estruturas e sua consequente identificação. Esse tubo é centrifugado



Figura 11- Sistema Diagnóstico de Parasitas - ParasiTrap® Fonte: <https://pt.vwr.com/store/product/11627971/system-for-parasitological-examination-of-stool-parasitrap-af>

durante 5 min, permitindo uma filtração da amostra, restando apenas o que é de interesse clínico. Esse tubo depois segue para o setor da microbiologia onde é feita a identificação das possíveis estruturas de parasitas.

7. Microbiologia

Os procedimentos realizados neste setor são, respectivamente, o recebimento, processamento e validação de amostras de urina, fezes, exsudados nasais, exsudados vaginais, tecidos, esperma, entre outros.

7.1 Urinas

A maior parte das amostras que são processadas diariamente são as urinas. São recebidas cerca de 2000 amostras. Entre elas estão os pedidos de urinas tipo 2, urinas em que é necessário realizar o exame bacteriológico e urgências, indicadas com etiquetas amarelas. Caso seja necessário realizar ambos os exames, para o bacteriológico, primeiro a amostra deve ser semeada em meio CLED (agar de cistina lactose deficiente em electrólitos) por estria simples, para depois ser colocada o mais brevemente possível no Sysmex® Série-UN (combinação dos analisadores automatizados de urina). Essa ordem contribui para que a sementeira tenha menor contaminação.

Todos os meios de cultura utilizados não são produzidos no próprio laboratório, são adquiridos em uma empresa de referência chamada Thermo Fisher. Os meios de cultura utilizados pelo laboratório estão descritos no **Anexo 1**.

O equipamento Sysmex® possui integração da análise química no UC-35000, que realiza análise bioquímica da urina, com uso da fita reativa. A fita reativa avalia a densidade, pH, presença de glicose, proteínas, eritrócitos, leucócitos, cetonas, urobilinogénio e bilirrubina e nitrito. Em seguida, segue para o analisador de partículas e/ou sedimentos, no UF-5000 através de um sistema ótico formado por um laser semiconductor azul. Os sedimentos podem conter cristais, cilindros, células epiteliais, bactérias, leucócitos e eritrócitos. Quando ocorre alguma discrepância entre os resultados bioquímicos e de sedimento como por exemplo presença de muitos leucócitos ou bactérias na fita reativa sem aparecerem nos sedimentos, é feita uma análise das imagens digitais da urina produzidas no UD-10 que, integrado ao UF-5000, utiliza tecnologia de digitalização de imagens das partículas da urina, que possibilita a confirmação da presença de elementos patológicos ou a avaliação dos resultados obtidos previamente pelos modelos UC3500 e UF-5000. O técnico é responsável por filtrar o que é ou não relevante. Normalmente são identificados cristais, como de oxalato de cálcio, células epiteliais, bactérias e eritrócitos.

O controlo de qualidade destes equipamentos é realizado todos os dias pela manhã, por um dos técnicos, utilizando amostras com valores conhecidos, disponibilizados pelo fornecedor. A calibração dos mesmos é feita uma vez ao mês, normalmente no início do mês.

Os parâmetros mais relevantes e essenciais para o seguimento das análises microbiológicas são, a presença de leucócitos, nitritos (pois muitas vezes nitrito positivo é um sinal indireto da presença de bactérias já que a urina é rica em nitratos e algumas bactérias conseguem metabolizar esses nitratos em nitritos) e a contagem de bactérias.

Após irem ao Sysmex®, estas urinas são armazenadas de acordo com seu número e posição na rack, por aproximadamente 24h, refrigeradas para que, se necessário, alguma análise possa ser repetida. Após este período, devem ser descartadas, pois não mantêm estabilidade e os resultados de repetições de análises ficariam comprometidos.

O processamento das urinas de urgência é exatamente igual às casuais, pois todas devem aguardar o tempo mínimo de incubação de 18h a 37°C, em estufa com oxigénio. Nestas amostras é colocada uma etiqueta amarela e estas possuem uma estufa específica apenas para melhor localização.

Existem alguns pedidos médicos de urinas minutadas. Essas amostras são colhidas de 3 em 3 horas, então exige um processamento mais veloz. Normalmente é feita para doentes com diabetes, para avaliar a presença de glicose na urina. Deve-se analisar com mais cautela a fita reativa juntamente com os sedimentos. Se necessário, preparar manualmente uma lâmina.

As amostras que foram semeadas em meio de CLED são incubadas por, no mínimo, 18h, a 37°C em estufa de oxigénio, para se analisar o crescimento. Logo pela manhã, as placas do dia anterior são retiradas da estufa e separadas em: negativas (em que não houve crescimento significativo aparente), positivas (com crescimento puro aparente) e polimicrobianas (com crescimento aparente de mais de um tipo de microrganismo).

A semeadura inicial é feita com 1µL de urina pela técnica da estria simples, caso a cultura seja polimicrobiana e o isolamento seja relevante, o mesmo deve ser feito pela técnica em esgotamento de 3 quadrantes. **(Figura 12)**

Também é possível que haja requisição médica para exame micológico na urina, apesar de ser mais raro, e, neste caso, o material é semeado em ágar CLED e Sabouraud pois, apesar dos fungos poderem aparecer em ágar CLED, possuem um crescimento melhor em Sabouraud.

As amostras negativas, com ausência de crescimento, são mais rapidamente processadas. O analista precisa de avaliar os sedimentos e principalmente a presença de leucócitos. Se houver uma contagem de mais de 100 leucócitos por campo pelo Sysmex®, a urina deve ser semeada novamente em meio de cultura ágar chocolate, que é mais rico em nutrientes, possibilitando o crescimento de bactérias mais exigentes que podem não ter crescido em meio CLED.



Figura 12- Técnica de Esgotamento em 3 quadrantes

Fonte: https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdempip/?page_id=80

Pode existir algum crescimento nos meios das urinas consideradas negativas, por isso é observada a quantidade e aspecto das colônias. Esse crescimento pode ser alguma bactéria habitual da flora, ou alguma contaminação na placa. Em ambos os casos não é considerado relevante.

A leitura do número de colônias no exame bacteriológico é feita através da Unidade Formadora de Colônia (UFC) por mil. O crescimento de uma colônia é considerado 10^3 UFC/ml. De até 30 colônias seria 10^4 UFC/ml, normalmente, quando cobre metade da placa, e até 100 colônias, 10^5 UFC/ml, quando cobre toda a placa, sendo indicativo de uma possível infecção.

Dentre os meios onde houve crescimento significativo estão as com culturas puras e as culturas polimicrobianas (com mais de um tipo de colônia na placa). Essas culturas polimicrobianas devem ser analisadas uma a uma para verificar se o crescimento é significativo. Caso seja identificado um padrão mais predominante, essas colônias são isoladas e semeadas novamente. Este isolamento é importante para que o teste de sensibilidade aos antibióticos não seja incongruente e inespecífico. Nestes casos também se avalia o sedimento. A maior parte das dúvidas é quando são identificados muitos leucócitos no sedimento, entretanto, não existe crescimento de possível patogenicidade na placa. Neste caso, a urina deve ser semeada novamente, em ágar chocolate. Quando existe muito crescimento inespecífico na placa e poucos leucócitos ou bactérias encontradas no sedimento, suspeita-se de contaminação na coleta e falta de higienização correta.

As culturas puras também são avaliadas individualmente, levando em consideração o caso clínico do paciente, principalmente a idade e histórico clínico. Normalmente a partir do crescimento dessas colônias é feita a identificação em MALDI-TOF (ionização e dessorção a laser assistida por matriz) e painel de antibiograma.

As placas com crescimento significativo são guardadas até que o resultado do antibiograma seja aprovado pela validação. As mesmas ficam no equipamento durante pelo menos 16h, portanto, as leituras são sempre feitas no dia seguinte.

Os analistas devem ter um cuidado especial com pacientes grávidas. Caso não venha sinalizado na ficha do doente, verificam-se as outras análises pedidas pelo médico, sendo possível identificar pelos exames que normalmente são requisitados para mulheres grávidas. A maior preocupação com estas pacientes é a infecção pelo *Streptococcus agalactiae* Beta hemolítico. Trata-se de um coco gram-positivo, anaeróbio facultativo comensal do organismo que entretanto apresenta-se como principal patógeno responsável por infecções que podem levar à morte de recém-nascidos durante o parto [2].

Em caso de pesquisa de *S. agalactiae* na urina, a colónia com suspeita deve ser pura, portanto, é isolada, semeada e incubada durante 24h em caldo TODD de enriquecimento, que estimula a produção de hemolisina estreptocócica. O caldo então é semeado em meio cromogénico por 48h. Se houver crescimento de colónias suspeitas, deve ser feita a identificação.

7.2 Identificação e Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos

O equipamento onde é feita a identificação a nível de género e espécie das bactérias e também de alguns fungos é o Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry, também chamado de MALDI-TOF MS, que se baseia na técnica de ionização utilizada em espectrometria de massa que permite a análise da composição química celular dos microrganismos possibilitando a identificação dos mesmos através do comprimento de onda de suas biomoléculas (DNA, proteínas e açúcares), em alguns minutos. Sendo um método rápido, preciso e económico, é o golden standard nos laboratórios de microbiologia [3].

Para realizar essa identificação, uma colónia pura obtida do crescimento num meio de cultura, é seleccionada, depositada e seca no suporte. Várias colónias diferentes podem ser lidas de uma vez num mesmo suporte. Utiliza-se uma matriz liofilizada proveniente do fabricante, que deve ser reconstituída para o uso. Essa matriz é adicionada sobre a colónia no suporte. Também se adiciona uma amostra controlo, que contém uma *Escherichia coli* com comprimento de onda conhecido. Este suporte é colocado sobre uma placa metálica e introduzida no MALDI-TOF MS. Primeiro, o aparelho identifica o controlo e, só depois, segue para as amostras, permitindo alertar de qualquer possível erro logo no início da leitura.

Os resultados são dados através de um score ideal. Caso esteja abaixo do ideal, a identificação não possui exatidão, entretanto deve-se levar em consideração todos os picos

encontrados pelo aparelho, daquela mesma amostra, e se os mesmos forem precisos e identificarem sempre a mesma bactéria, o score pode ser válido. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) podem ser feitos no equipamento MicroScan WalkAway, que possui um sistema automatizado que suporta até 96 painéis e realiza o controle de incubação e dos reagentes necessários. **(Figura 13)** Baseia-se numa placa com 96 poços com uma microdiluição específica dos antibióticos mais utilizados, em cada. São selecionadas algumas das colônias com interesse de identificação que cresceram no meio de cultura, é preparada a suspensão bacteriana padronizada e em seguida utiliza-se um inoculador que permite que todos os 96 poços do painel sejam inoculados ao mesmo tempo, agilizando o processo.



Figura 13- Painéis utilizados para o TSA no MicroScan® WalkAway®

Fonte: <https://www.corporativodeqsa.com.mx/>

Este equipamento permite realizar o TSA de bactérias gram negativas e gram positivas. Os dois tipos de painéis utilizados para cada uma das bactérias são diferenciados pelo aparelho através da posição LOC, que se localiza em locais diferentes em cada um.

Para a determinação do resultado, é analisada a MIC (concentração mínima inibitória). A leitura é feita através da turvação ou aparição de um botão, que significa resistência aquela concentração de antibiótico, ou da ausência de turvação, que indica sensibilidade àquele antibiótico. Desta forma, a MIC de um antibiótico é definida pela menor concentração que seja suficiente para inibir o crescimento visível de uma bactéria, e este antimicrobiano é escolhido como mais eficaz para o tratamento da doença. A maior parte das bactérias estudadas apresentam sensibilidade a mais de um tipo de antibiótico presente na placa, possibilitando mais de uma alternativa de tratamento.

Outro equipamento do laboratório que pode ser utilizado para teste de TSA e também identificação microbiana é o VITEK System (bioMérieux, France). Também automatizado, utiliza painéis de antibióticos com combinações pré-estabelecidas. Após o isolamento do microrganismo, é feita uma padronização do inóculo. Este inóculo é colocado em uma cassette com uma respetiva carta e os dois são associados virtualmente.

Existem diversas cartas descartáveis que devem ser utilizadas de acordo com a necessidade, como: identificação de bacilos gram-negativos, bactérias gram-positivas, leveduras, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.* e outras bactérias gram-negativas fastidiosas, e bactérias anaeróbicas. São utilizadas cartas de TSA contendo diversos poços contendo antibióticos, onde se monitoriza o crescimento microbiano. O VITEK analisa continuamente

o crescimento, utilizando diversos parâmetros para determinar a MIC. Um único poço é capaz de fornecer informações para mais de uma MIC, pois a atividade do microrganismo em um poço pode ser interpretada em uma escala mais informativa do que apenas crescimento ou nenhum crescimento visível.

Possui um banco de dados um pouco diferente do que o MicroScan WalkAway, permitindo captar outras sensibilidades ou resistências. Normalmente não é a primeira opção de uso para a rotina, pois leva um pouco mais de tempo para preparação das amostras, mas é muito utilizado para confirmação do MicroScan WalkAway ou principalmente para leitura dos *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*, além de diferenciação de *Escherichia coli* e *Shigella* spp. nas fezes. Os resultados costumam sair no mesmo dia, portanto é uma boa alternativa em casos de necessidade de repetições de amostras que precisem de uma rápida resolução.

Em alguns casos, o laboratório também realiza o teste qualitativo de difusão de discos em ágar, onde é avaliado a medida do halo de inibição em milímetros. É um método padronizado, onde deve ser levado em consideração a composição química do meio de cultura (ágar Mueller-Hinton, com 4 a 6 mm de espessura); densidade do inóculo (suspensão de 0,5 na escala McFarland¹), concentração dos antimicrobianos nos discos, temperatura de incubação, entre outros.

Outra alternativa é o teste quantitativo E-test, que utiliza uma fita de material plástico impermeável contendo um antibiótico e uma grade de leitura e escala de interpretação da MIC. Esse método é sempre utilizado quando o microrganismo em questão é a *Neisseria gonorrhoeae*, para confirmar resistência à azitromicina que tem se observado em alguns casos.

7.3 Controlo Externo

O NEQAS da microbiologia envia semestralmente amostras de bactérias, parasitas e fungos que devem ser processadas normalmente, sendo feita identificação e TSA quando necessário. Os resultados são enviados para a organização, e o laboratório pontua em caso de estarem corretos. É uma boa avaliação das técnicas utilizadas e conhecimento dos trabalhadores do laboratório.

¹ A escala nefelométrica de Mc Farland é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. Esta multiplicação manifesta-se nos meios líquidos por um aumento das partículas (bactérias) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura [4].

Durante o estágio foi possível acompanhar a identificação de quatro tipos de bactérias provenientes de amostras liofilizadas, cada uma com um caso clínico diferente. Também fungos, onde, após crescimento em ágar Sabouraud, foi possível observar e identificar com o auxílio da literatura, algumas estruturas pelo microscópio. E em parasitologia, foi identificado o *Enterobius vermicular* em análise da lâmina ao microscópio, pela técnica de fita cola.

7.4 Fezes e outros materiais

As urinas fazem parte da maior parte das amostras que são analisadas diariamente no laboratório, entretanto, muitos outros microrganismos podem ser patogênicos e são encontrados noutros tipos de amostras.

Para as amostras de fezes que chegam ao laboratório, é feita a coprocultura. A sementeira inicial deve ser feita em ágar MacConkey, XLD, Campyloset e enriquecimento em caldo Rappaport. Após as 18h de incubação, o caldo de enriquecimento deve ser semeado também em ágar XLD. Caso tenha um pedido médico para exame micológico, a sementeira inicial deve ser feita também em ágar Sabouraud. Os meios de cultura devem ser incubados durante 48h.

Quando há pedido médico para análise de *Clostridium difficile*, uma bactéria associada à diarreia persistente normalmente resultante do uso de antibióticos, é realizado um imunoensaio qualitativo capaz de identificar a toxina produzida por esta bactéria.

Em suspeita de Salmonella nas fezes, a amostra é semeada em meio XLD específico para essa bactéria. O crescimento de colônias negras é indicativo de positividade, porém, sempre deve ser feita identificação e antibiograma. Se necessário, o isolamento é feito em ágar CLED, por se tratar de uma bactéria gram negativa.

Em parasitologia, algumas amostras de fezes já são preparadas no pré-analítico e o setor da microbiologia é responsável apenas por preparar o esfregaço e realizar o exame a fresco, para pesquisa dos parasitas, como a *Giardia* sp.

Alguns exames são a fresco, utilizando apenas lâmina e lamínula e observação ao microscópio. Normalmente um profissional capacitado é capaz de identificar células, leucócitos e leveduras, por exemplo. Os exames mais comuns são procura por *Trichomonas* nos exsudados vaginais, espermatozoides e parasitológico de fezes.

As amostras de fezes são todas armazenadas até que os resultados sejam validados. Todo este processo de incubação, re-incubação, análise e antibiograma pode durar por volta de uma semana. Antes dos técnicos descartarem as amostras, verifica-se o status de cada uma, para garantir que todas foram processadas.

Amostras do trato respiratório superior, como o exsudado orofaríngeo, devem ser semeadas em gelose sangue; nas secreções respiratórias, deve ser feito exame direto com coloração em Gram e Ziehl-Neelsen e sementeira em gelose sangue, chocolate e MacConkey.

Para amostras do trato genito-urinário, além do exame a fresco e gram, para exsudados uretrais a sementeira deve ser feita em gelose chocolate e VCAT ágar; para exsudados vaginais deve ser em gelose sangue, VCAT ágar e Sabouraud quando requisitado, e para esperma deve ser feita em gelose sangue, chocolate, VCAT ágar e MacConkey.

Para amostras de pele e tecidos moles, como feridas, o exame direto deve ser feito em coloração de Gram e a sementeira em gelos e sangue, MacConkey e Manitol Salt Agar (MSA).

Amostras de sangue como hemoculturas, além da coloração de Gram deve ser feita sementeira em gelos e sangue; para exsudatos de cateter, além da gelose sangue deve ser semeado em Manitol (MSA). Para a ponta de cateter deve ser feita apenas sementeira em gelos e sangue pela técnica de rolamento.

Para líquidos das cavidades como peritoneal/ascítico, pleural, pericárdico e sinovial, é feito o exame direto com coloração de grama e o exame cultural em gelos e sangue, chocolate, MacConkey e Caldo de Soja.

Na pesquisa de fungos em amostras de unha, pele e couro cabeludo, deve ser feita a sementeira em 2 meios: ágar Sabouraud e ágar Mycosel. O ágar Mycosel inibe o crescimento de alguns fungos não patogênicos como bolores e leveduras saprófitas e facilita o isolamento de dermatófitos. Estes podem ficar em incubação e incubação durante até 1 mês, pois são de crescimento lento, diferente de fungos leveduriformes como do gênero *Candida* que levam por volta de 48 horas para o crescimento de colônias.

Para muitas dessas análises, são feitas colorações de lâminas que seguem as técnicas de Gram e Ziehl-Neelsen. A técnica de coloração de Gram é utilizada para diferenciar as bactérias em gram-positivas e gram-negativas, com base em suas características de coloração em lâminas de microscopia. As bactérias gram-positivas aparecem em roxo, enquanto as gram-negativas aparecem em rosa ou vermelho. Já a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen é utilizada especificamente para detectar bactérias álcool-ácido resistentes, como o *Mycobacterium tuberculosis*, que é a bactéria causadora da tuberculose. Nesta técnica, as bactérias são coradas em vermelho brilhante e o fundo em azul, facilitando a visualização da bactéria em amostras clínicas, como escarro ou líquidos corporais [5].

A sequência dos exames é dada após as farmacêuticas avaliarem as lâminas e as sementeiras. Em casos positivos, normalmente o procedimento deve ser realizar a

identificação e o TSA. Possivelmente também é necessário novo isolamento ou reintubação.

7.5 Bebê Vida

O Bebê Vida trata-se de uma empresa particular que realiza o processamento e criopreservação de células estaminais, também conhecidas por células “tronco”, provenientes do sangue do cordão umbilical e tecido do cordão umbilical.

O laboratório de microbiologia recebe material do Bebê Vida para realização do controlo microbiológico destas amostras. O sangue é normalmente estéril, portanto, não é esperado que tenha qualquer crescimento.

Chegam amostras de hemocultura, em que a amostra de sangue é incubada num frasco anaeróbio que promove o crescimento de microrganismos, durante 7 dias, em um aparelho que serve como estufa. A estufa é equipada com um sensor capaz de identificar caso tenha algum crescimento no meio que está na base do frasco, durante estes dias. Ao final do período de incubação, as amostras sem crescimento são dadas como negativas.

As amostras com crescimento são semeadas em 2 placas: uma de água sangue e uma de ágar chocolate, em estufa aeróbica e outra anaeróbica, respectivamente. Ambos são incubados com 1 disco de penicilina e 1 de netilmicina, que são os antibióticos mais comuns que inibem o crescimento de bactérias anaeróbicas. Se houver crescimento em ambas as placas significa que a cultura não está pura, e deve ser feito isolamento pelas colónias que cresceram mais próximas do disco de antibiótico que apresentou inibição em ambos os meios. É semeado novamente em anaerobiose. Este procedimento é feito para todas as amostras de hemoculturas que tiverem alerta de crescimento, e não apenas as amostras de Bebê Vida.

Após o crescimento de colónias, é feita identificação e antibiograma, pelas técnicas já conhecidas. Deve-se levar em consideração que o crescimento pode ser decorrente de contaminações durante a coleta e processamento da amostra.

7.6 Validação

A validação dos resultados obtidos após o processamento das amostras positivas de urina e de todos os outros materiais, é sempre realizada pelas farmacêuticas do setor. Durante o estágio a aluna teve oportunidade de acompanhar e aprender também como é feita a validação dos resultados e libertação dos boletins médicos do laboratório.

Os resultados que apresentarem coerência tanto na identificação em MALDI-TOF quanto no antibiograma pelo MicroScan WalkAway ou VITEK, são validados mais

rapidamente, pois, o próprio sistema consegue cruzar os resultados. Este sistema é equipado por uma base de dados onde válida se o inóculo identificado corresponde corretamente ao resultado de seu teste de sensibilidade aos antimicrobianos que seria esperado, de acordo com a bibliografia e os parâmetros estabelecidos pelos médicos do laboratório, levando em consideração a população de Portugal e da Europa. Como é grande o número de amostras diário, esse mecanismo simplifica a validação que ainda deve ser feita pelas farmacêuticas.

As placas de antibiograma que indicarem algum tipo de erro durante a noite, são retiradas do equipamento na parte da manhã e analisadas pela validação. Alguns problemas comuns são bolha de ar no poço da placa, contaminação do poço com meio de cultura e contaminações em geral, que podem indicar um falso positivo ou negativo. O sistema emite este alerta pois o resultado obtido na análise não é o esperado para o tipo de microrganismo que foi identificado previamente. Colónias mucóides são mais elásticas e, portanto, mais difíceis de emulsionar com a solução diluente do TSA e acabam por apresentar mais erros de leitura no Walkway e no VITEK. Cada caso é avaliado individualmente, juntamente com as sementeiras e se necessário é feita a repetição do teste.

Como mencionado anteriormente, o sistema informático e os equipamentos do laboratório são interligados, portanto, de acordo com a leitura da placa pelo MicroScan WalkAway, são recomendados antibióticos de primeira linha, dos quais são mais aconselháveis em relação à administração e espectro de atuação. Os antibióticos de segunda linha não aparecem no boletim, entretanto, a farmacêutica deve avaliar a resistência da bactéria e caso julgue necessário, recomendar outros medicamentos. É importante sempre avaliar a geração do antibiótico e se a sensibilidade ou resistência são coerentes.

A escolha do tratamento mais apropriado para ser emitido no boletim médico deve levar em consideração a procedência do doente, se veio da clínica, ambulatório ou, por exemplo, caso seja hospitalar, possuem uma gama de medicamentos diferentes para administrar, inclusive intravenosos. O mesmo serve para doentes de lares e residências de idosos. Também é importante avaliar se o doente possui histórico recente de alguma infecção por bactérias com resistências a antibióticos. Essas informações sempre devem acompanhar a ficha do doente. Se possível, a preferência é o uso de antibióticos beta-lactâmicos como penicilinas e carbapenémicos, que se definem pela presença do anel beta-lactâmico, tendo uma excelente eficácia terapêutica, baixa toxicidade e menores efeitos adversos. Levar em consideração se os antibióticos de primeira linha que o

microrganismo apresentou sensibilidade, são todos da mesma classe de medicamentos, caso sim, não é necessário todos irem no boletim, apenas o medicamento principal, se forem de classes diferentes é recomendado aparecerem todos, levando em consideração as observações anteriores.

Algumas bactérias possuem características específicas e apresentam resistência a determinadas classes de antimicrobianos. Em caso de dúvida é preciso consultar as diretrizes referentes a sensibilidade e resistência a antimicrobianos, assim como a MIC de um medicamento, para confirmar os resultados dos equipamentos.

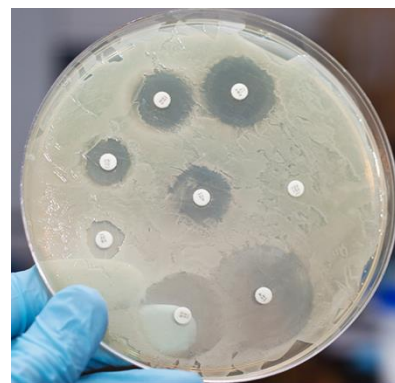


Figura 14- Exemplo de Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos manual

Fonte: <https://kasvi.com.br/uso-aplicacao-agar-mueller-hinton/>

O TSA manual pode ser feito em casos onde o doente apresenta uma infecção recente pela mesma estirpe de bactéria que apresentou resistência a determinado medicamento como ampicilina/amoxicilina, na infecção passada, e encontra-se sensível para a amostra atual. **(Figura 14)** É importante realizar esta confirmação para que não haja um uso indevido de medicamentos.

A validação correta depende muito da avaliação da procedência do doente, coleta, tipo de amostra, procedimentos técnicos de cultura, isolamento e identificação, pois cada microrganismo possui características específicas que dependem de um tratamento correto para o devido diagnóstico.

7.6.1 *Streptococcus agalactiae*

A pesquisa desse microrganismo é importante principalmente em mulheres grávidas, por apresentar risco de infecção neonatal durante a gravidez e pós-parto estando associado a taxas de mortalidade. Trata-se de um coco gram positivo, anaeróbio facultativo, que pode fazer parte da microbiota vaginal sem causar qualquer sintoma. Caso a paciente apresente muitos nitritos e bactérias no exame de urina tipo 2, sintomas de desconforto, ou rastreio em caso de mulheres grávidas, a patogenicidade desse microrganismo deve ser levada em consideração.

Na amostra de urina, após a sementeira inicial em ágar CLED, seu isolamento deve ser feito em gelos e sangue, que proporciona um melhor crescimento das colônias para que seja possível realizar o TSA. Esse exame deve ser feito no VITEK.

A pesquisa em mulheres grávidas entre 35-38 semanas, quando houver requisição médica, também pode ser feita através do exsudato vaginal/retal. A amostra é colocada em caldo de enriquecimento durante 24h e depois semeada em chromID Strepto B e

incubada até 48h. Caso apresente crescimento de colônias suspeitas, é feita identificação e TSA.

7.6.2 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Um tipo de resistência que merece destaque é a estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que pode ser facilmente encontrada na cavidade nasal ou na pele, inclusive sendo 30% da população mundial portadora permanente, sem apresentar sintomas ou doenças. Entretanto, é um dos principais agentes de infecções nosocomiais (adquiridas nos hospitais) e adquiridas na comunidade.

Devido ao uso irracional de medicamentos, uso alargado e prescrições indevidas de antibióticos, estes microrganismos sofreram alterações genômicas produzindo enzimas que degradam o anel β -lactâmico do antibiótico. Estes β -lactâmicos são capazes de ligar e inativar enzimas necessárias para a síntese da parede celular bacteriana, portanto, estirpes de bactérias capazes de produzir a enzima beta-lactamase inativam antibióticos com o anel beta-lactâmico, como penicilinas. Entretanto, existem penicilinas que são resistentes a β -lactamase, como a meticilina, que pode ser utilizada no tratamento de infecções causadas por estirpes de *Staphylococcus aureus* meticilina sensíveis (MSSA). Com o aumento de infecções por MRSA, ocorreu uma seleção de microrganismos resistentes que desenvolveram o gene *mecA* 3, originando os *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) [6].

Com o aumento de microrganismos multirresistentes e um significativo número de mortalidade das infecções provocadas por MRSA, é de extrema importância que os profissionais de saúde consigam prevenir, rastrear e identificar corretamente ao cruzar com uma resistência bacteriana, evitando ao máximo o uso indevido de medicamentos.

No laboratório é utilizado o meio MRSA, um meio de cultura cromogênico e seletivo para o crescimento destas estirpes de *Staphylococcus* resistentes à meticilina. As colônias crescem numa tonalidade azul escuro (**Figura 15**) e mesmo quando há crescimento é preciso isolar, identificar e realizar o TSA, pois mesmo crescendo neste meio, nem todos os *Staphylococcus* são



Figura 15- Exemplo de uma placa com meio seletivo cromogênico MRSA e crescimento de estirpe resistente de *Staphylococcus aureus*.

Fonte: www.wired.com/wiredscience/2012/02/mrsa-vaccine/#more-94737

resistentes e o crescimento pode ser falso positivo. Para uso tópico, a mupirocina pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções por MRSA, ou na prevenção da disseminação em lares e hospitais.

Em muitos exames para medicina do trabalho e exames de admissão para internamento, é exigido um rastreio de *S. aureus* em exsudato orofaríngeo. Nestes casos as amostras já são semeadas em meio MRS, água sangue para o crescimento de cocos em geral incluindo o *S. pyogenes*, e meio Manitol. Este último auxilia a identificação, por ser um meio com muito sal, permite o isolamento seletivo *Staphylococcus* sp., e identificação presuntiva de *S. aureus*. Caso o coco cresça no meio de água sangue e não no meio MRSA significa que o *S. aureus* não é meticilina resistente e, portanto, não tem valor clinicamente relevante.

De acordo com a Direção-Geral de Saúde (DGS), existe uma norma onde é necessário notificar casos de resistência antimicrobiana ao *Staphylococcus aureus* através do Sistema de Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. Além disso, esses microrganismos notificados devem ser conservados e enviados em cultura pura para o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) em até 48 horas.

7.6.3 Fezes

Em amostras de fezes, avalia-se presença ou não de bactérias gram negativas do gênero *Shigella*, *Salmonella* e *Campylobacter*, possíveis causadoras de gastroenterites.

O gênero *Campylobacter* se diferencia dos outros da família Enterobacteriaceae por ser oxidase positiva e precisar de microaerofilia para se desenvolver, crescendo em meio seletivo Campylosel. A espécie mais comumente encontrada é *Campylobacter jejuni*, que causa diarreia profunda, aquosa e sanguinolenta. Em caso do meio de cultura apresentar suspeita de crescimento de colónias patogénicas, é feito um teste de oxidase em tiras (azul se positivo). Se a prova de oxidase for positiva, ou em caso de dúvida, é feita a identificação. Essas bactérias gram negativas, após sua identificação por MALDI-TOF, de acordo com as diretrizes, o seu TSA deve ser manual, através de disco-difusão em ágar. Para a realização do antibiograma manual, é utilizado o ágar Muller-Hinton (MH), um meio padronizado e recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Tratando-se de um material rico em microrganismos, é esperado que as sementeiras de fezes apresentem crescimento, entretanto, é preciso valorizar apenas as colónias características para as bactérias patogénicas investigadas. Na ausência de colónias específicas o exame é avaliado como negativo, mesmo com crescimento inespecífico na placa.

Quando a identificação por MALDI-TOF resulta em *Escherichia coli*, o procedimento deve ser isolar a cultura em ágar CLED. Caso o crescimento seja fermentador de lactose, assume-se que se trata de uma *E. coli* e não é necessário realizar TSA pois esta bactéria não é patogénica quando encontrada nas fezes. Caso seja lactose negativa, a identificação é confirmada através do VITEK. Isso acontece, pois, a composição química da *E. coli* assemelha-se a da *Shigella*, e algumas vezes a base de dados do equipamento pode não ser precisa.

Se o meio XLD específico para crescimento e diferenciação de *Shigella* e *Salmonella* apresentar crescimento de colónias negras suspeitas de *Salmonella* (**Figura 16**) em menos de 48h de incubação, já deve ser feita a identificação. Não se costuma ter dúvidas quanto ao resultado.

Também é possível encontrar o género *Candida* nas fezes, quando semeado em ágar Sabouraud, porém o médico deve avaliar se o achado é clinicamente relevante com o histórico do paciente.

O *Proteus*, também é um bacilo gram negativo, anaeróbio facultativo pertencente à família das Enterobacteriaceae, que pode fazer parte da microbiota do intestino. Entretanto, merece atenção quando encontrado na urina, por causar infeções no trato urinário, realizando um véu de cepas (swarming) característico quando semeadas no meio de cultura, que pode ser evitado utilizando água CLED.



Figura 16- Exemplo de meio XLD com crescimento de *Salmonella* Fonte: <https://www.flickr.com/photos/nathanreading/5833401441/in/photostream/>

7.6.4 Enterobacteriaceae Resistentes a Carbapenems

As Enterobacteriaceae constituem uma família de bacilos gram negativos com diferentes géneros e centenas de espécies sendo algumas patogénicas primárias e outras comensais do intestino humano e de outros animais, podendo causar doenças em determinadas condições e hospedeiros, como *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Serratia* spp e *Enterobacter* spp. Podem causar infeções urinárias, intra-abdominais ou bacteremias. Já as Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos (ERC) são um subgrupo da família que são dotadas de resistência aos antibióticos do grupo carbapenemos (ertapenem, imipenem, meropenem), de acordo com as definições microbiológicas europeias da rede Comité Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST) [7].

A aquisição das resistências se dá através de um ou mais mecanismos e depende da mutação genética da variante que irá lhe conferir diferentes perfis de sensibilidade

antibiótica. Algumas ERC são produtoras de betalactamase (AmpC) e outras são produtoras de enzimas determinadas carbapenamases [7].

Uma das estirpes resistentes, com grande importância clínica, é a *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC), responsável por surtos esporádicos e maior transmissibilidade que as demais ERC. Sendo assim, apresenta risco para ambientes hospitalares e lares de idosos, com imunidade reprimida.

No laboratório, a ERC mais comumente identificada é a KPC. Normalmente é utilizado o meio cromogénico específico para ERC para o rastreio em amostras de fezes. Após o procedimento de identificação e TSA, por se tratar de uma bactéria que apresenta resistência a praticamente todos os antibióticos mais utilizados, é realizado um teste rápido cromatográfico confirmatório da carbapenemase produzida pela bactéria em questão, para que seja indicado o antibiótico mais apropriado. Utilizando a colónia da sementeira de urina (caso a estirpe identificada na amostra seja resistente), exsudado retal ou pus, este teste permite a identificação de KPC, Oxacilinase tipo 48 (Oxa-48) e Nova Deli Metallo-betalactamase (NDM).

Todas as bactérias identificadas como ERC devem ser congeladas e armazenadas durante 6 meses. De acordo com as novas normas da DGS, a sua notificação é automática através do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE).

7.6.5 Exsudados vaginais, uretrais e espema

Para amostras de exsudados vaginais, uretrais e esperma, sempre se avalia a lâmina corada pelo gram e os meios de cultura que devem ser incubados por 48h. Os patogénicos mais procurados são a *Neisseria gonorrhoeae* no meio VCAT ágar, que apresenta colónias muito pequenas e transparentes. Trata-se de uma bactéria gram negativa e oxidase positiva que causa gonorreia, que atinge tipicamente o epitélio da uretra, colo do útero e reto, causando irritações e secreções, transmitida por contato sexual. Para despiste, é possível realizar a prova da oxidase. Na lâmina, apresenta-se como diplococos muito pequenos, porém característicos.

Após crescimento de colónias características em VCAT, é necessário realizar outra cultura com um e-test (bioMérieux), que é uma forma de determinar a sensibilidade antimicrobiana semelhante ao uso dos discos, mas utilizando uma tira impregnada com antibiótico em concentrações padronizadas, em uma placa de ágar. Além do TSA pelo WalkAway, esta técnica permite detetar com segurança a resistência emergente de *N. gonorrhoeae* a antibióticos de primeira linha, como a azitromicina.

No esperma, também se procura *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella* e fungos. Podem ser visualizados na lâmina, que também tem a presença de cocos que fazem parte

da flora bacteriana. Normalmente o crescimento das placas é muito inespecífico e poluído, em decorrência de uma coleta mal feita e má higienização da genitália.

Em amostras de exsudados vaginais, a *Gardnerella vaginalis* é a causa comum de vaginose em mulheres que apresentam queixas. Trata-se de uma bactéria gram variável, cocobacilar que na placa de ágar sangue, apresenta colônias pequenas e esbranquiçadas. A confirmação de sua identificação é clara através da lâmina corada por apresentar uma formação típica denominada de “Clue cells”, que são células epiteliais cobertas por bactérias, neste caso, a *Gardnerella vaginalis*. **(Figura 17)** Esta formação é característica

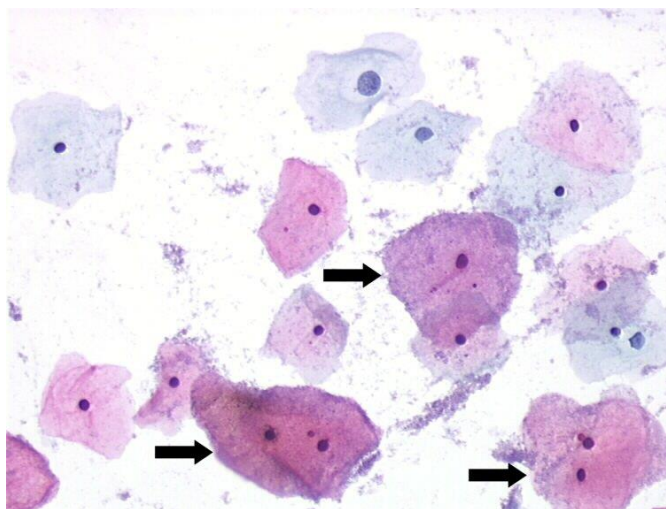


Figura 17- *Gardnerella vaginalis* indicado pelas setas, ao redor de células epiteliais. Lâmina corada por gram
Fonte: <https://screening.iarc.fr/atlasglossdef.php?lang=4&key=Gardnerella%20vaginalis&img=cyt14710>

de vaginose bacteriana, que pode ter como causa outras espécies de bactérias patogênicas. A presença do gênero *Mobinculos*, por exemplo, é um indicativo de desequilíbrio na flora vaginal e possível vaginose, sendo confirmados em lâmina pela presença de bacilos curvos gram negativos.

A flora vaginal é muito rica em microrganismos e, juntamente a bactérias patogênicas, é possível encontrar Bacilos de Doderlein, que se tratam de *Lactobacillus* que fazem parte da flora de uma mulher saudável. Eles aparecem como um tapete esverdeado na placa e na lâmina, são numerosos bacilos gram positivos que podem estar presentes em toda a amostra, servindo como bactérias protetoras da região.

7.6.6 Expectorações

Na avaliação de amostras de expectoração, ao observar a lâmina, primeiro é analisado se a coleta foi feita corretamente, sem muitas células presentes que indica uma mistura com a saliva do doente, dificultando a leitura. Verifica-se presença ou não de

bactérias e leucócitos, indicativos de patologia. Suas sementeiras também costumam ser muito polimicrobianas.

Uma bactéria comum por causar doenças do trato respiratório é o *Streptococcus pyogenes*, uma bactéria altamente infecciosa, capaz de causar faringites, escarlatina e febre reumática. Os estreptococos, da família *Streptococcaceae*, são caracterizados como cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não produtores de catalase e de oxidase. Algumas espécies, com o *S. pyogenes*, são capazes de produzir hemolisinas que causam uma hemólise característica em determinados meios de cultura, facilitando sua identificação [8].

Após 24 horas de incubação, a sementeira de água sangue é analisada para presença de hemólise na placa, caso não seja verificado, é necessária reincubação por mais 24 horas. *S. pyogenes* são beta-hemolíticos, ou seja, realizam a lise completa das hemácias que rodeiam a colônia, deixando uma zona transparente. Em lâmina, apresenta cocos gram positivos em cadeia.

No caso de *Streptococcus pneumoniae*, a sua identificação é feita através da visualização de diplococos gram positivos na lâmina e uma alfa-hemólise no meio de ágar sangue, uma hemólise parcial das hemácias, ocorrendo uma zona cinza esverdeada ao redor da colônia. Em caso de suspeita de crescimento desta espécie, é feito um teste com discos de Optoquina, um antibiótico seletivo para o *S. pneumoniae*, que se apresenta sensível na presença do mesmo, diferente de outras bactérias que podem apresentar alfa hemólise, como *Enterococcus*. É possível que numa mesma amostra existam duas espécies de bactérias, entretanto, é feita a identificação em MALDI-TOF e depois avalia-se qual a predominância.

Em suspeitas de *Mycobacterium tuberculosis*, responsável por causar tuberculose, é necessário realizar a coloração de Ziehl-Neelsen, pois esta bactéria possui uma camada incomum de cera em sua superfície que impossibilita realizar a coloração de Gram. É feita uma baciloscopia (pesquisa de BAAR - bacilos ácido resistentes) no esfregaço, dividindo a lâmina em quadrantes, sendo necessária a contagem dos bacilos em 100 campos. É dada uma classificação de BAAR de acordo com o resultado. O meio de cultura deve ser Lowenstein Jensen, específico para o crescimento de micobactérias, e o ideal são 8 semanas de incubação, pois trata-se de microrganismos de crescimento lento. Para uma confirmação mais rápida, o médico pode requisitar um exame direto de DNA pela biologia molecular.

Conclusão

O período de estágio profissionalizante desempenhou um papel fundamental na consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos durante o mestrado. Ter a chance de imergir na rotina de um laboratório de grande porte, caracterizado pelo constante fluxo diário de amostras, proporcionou uma experiência singular e altamente edificante. Esta vivência se destacou como uma perspectiva única em comparação com as experiências de estágios acadêmicos anteriores. Durante esse período, pude explorar e operar uma variedade de equipamentos, ampliando meu entendimento sobre o funcionamento prático de um laboratório equipado com sistemas automatizados.

Ficou evidente para mim que na área de análises clínicas, todos os procedimentos realizados demandam cuidado, meticulosidade, precisão e consistência. Afinal, o fornecimento de resultados confiáveis, que podem ter um papel crucial no prognóstico do paciente, depende do esforço dos profissionais envolvidos. É de extrema importância que como profissionais, estejamos constantemente atualizados diante da veloz evolução tecnológica na qual estamos imersos. Esta evolução certamente continuará a introduzir equipamentos e sistemas que otimizam as operações do laboratório.

Embora o laboratório seja segmentado em diversos setores, fica nítido que o trabalho em equipe assume uma importância ímpar. A obtenção de um boletim completo depende da colaboração precisa e harmoniosa de todos os profissionais, independentemente de sua especialização.

Acompanhar o fluxo desde a recepção até a validação de uma ampla gama de amostras proporcionou-me uma perspectiva humilde e um profundo respeito por todos os atuantes nessa área. Tive o privilégio de trocar experiências enriquecedoras e absorver lições valiosas, graças à paciência e dedicação exemplares de todos os envolvidos. Esses ensinamentos serão de grande importância ao longo da minha trajetória profissional

Referências Bibliográficas

1. De Santis GC. Anemia: definição, epidemiologia, fisiopatologia, classificação e tratamento. Medicina (Ribeirão Preto) [Internet]. 2019 Nov 7 [citado 12 maio 2023];52(3):239-251. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/156726>.
2. Genovese C, D'Angeli F, Di Salvatore V, Tempera G, Nicolosi D. Streptococcus agalactiae in pregnant women: serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Dez;39(12):2387-2396.
3. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):380-407.
4. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. Brock Biology of Microorganisms. 14th ed. Boston: Pearson; 2015.
5. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis. 2018;66(7):e1-e48.
6. Santos C, Nunes T, Branco M, André C, Antunes L. Staphylococcus aureus meticilina resistente (MRSA) no exsudado nasal: Poderá ser limitação profissional?. Rev Port Otorrinolaringol Cir Cabeça Pescoço. 2021;59(2):171-177.
7. PPCIRA - Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos. Recomendação: Prevenção da Transmissão de Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos em Hospitais de Cuidados de Agudos. Portugal: DGS; 2017. 20 p. Disponível em: <https://www.arscentro.min-saude.pt/wp-content/uploads/sites/6/2020/05/Recomendacao-prevencao-da-transmissao-de-enterobacteriaceas-resistentes-aos-carbapenemos-em-hospitais-de-cuidados-de-agudos.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2023.
8. Scalabrin R, Buss GD, Iamaguchi KCS, Cardoso CL, Garcia LB. Isolamento de Streptococcus pyogenes em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Rev Bras Otorrinolaringol. 2003;69(6):814-818.

Anexos

1. Meios de cultura utilizados no estágio

Meio de cultura	Características	Utilidade
Sabouraud	Meio que contém peptona e glicose, que favorecem o crescimento de fungos e leveduras. Tem um pH mais ácido (5,6), que dificulta o crescimento de boa parte das bactérias. Permite a caracterização macroscópica do fungo filamentoso.	Isolamento de fungos leveduriformes e filamentosos. 18-48h/37°C
Ágar Chocolate	Utiliza sangue de cavalo, carneiro ou coelho, onde suas hemácias são lisadas, liberando hemina e compostos muito nutritivos, permitindo o crescimento de microrganismos exigentes.	Crescimento de bactérias fastidiosas como <i>Haemophilus</i> spp., <i>Neisseria</i> spp. e outros microrganismos exigentes. 18-48h/37°C, 5% CO ₂
Ágar MacConkey	Possui cristal violeta e sais biliares, que inibe o crescimento da maioria das bactérias gram positivas, tornando-se seletiva para bactérias gram negativas. Também é diferencial pois identifica as bactérias fermentadoras de lactose (colônias rosas) das não fermentadoras (colônias incolores).	Isolamento seletivo de bacilos gram negativos (enterobactérias e não fermentadores de lactose) e verificação de fermentadores de lactose. 18-24h/37°C
Ágar Sangue	Composto por sangue de carneiro onde, a conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de hemólise nítida (α , β e γ). Uma base rica utilizada para o crescimento de vários microrganismos.	Isolamento de bactérias não fastidiosas, verificação de hemólise e auxílio na diferenciação de <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> spp. 18-24h/37°C
Ágar CLED	Ágar deficiente em eletrólitos composto por cistina e lactose. É diferencial, mudando a coloração na fermentação da lactose (colônias amarelas são positivas e colônias azuis são lactose negativa). A deficiência de eletrólitos inibe o véu de cepas do <i>Proteus</i> e <i>Shigella</i> sp.	Isolar e quantificar microrganismos gram positivos, gram negativos e leveduras. 18-24h/37°C
Meio Lowenstein Jensen	Meio contém ovo coagulado que serve como fonte de nitrogênio e, incorporado o glicerol, aumenta a fonte de obtenção do carbono que auxilia no metabolismo micobacteriano. O verde de malaquita evita o crescimento de bactérias contaminantes gram positivas e gram negativas.	Isolamento primário das micobactérias como <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . 37°C/2-8 semanas
Ágar Manitol	Elevada concentração de NaCl que inibe o crescimento da maior parte das bactérias gram negativas, permitindo o isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. A fermentação do manitol	Isolamento seletivo de <i>Staphylococcus</i> spp. e possível

	permite o diagnóstico presuntivo de <i>S. aureus</i> (colônias amarelas), através da coagulase.	identificação de <i>S. aureus</i> . 18-24h/37°C
Meio XLD	É um meio moderadamente seletivo com o uso do desoxicolato de sódio que inibe o crescimento de microrganismos gram positivos, possibilitando o isolamento e diferenciação de bactérias gram negativas, especialmente <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> . A xilose e a lisina permitem a diferenciação destas bactérias de outros microrganismos entéricos não patogênicos pois são os únicos que não fermentam neste meio. O indicador de H ₂ S permite a distinção da <i>Salmonella</i> que apresenta colônias vermelhas e com o centro preto.	Isolamento seletivo e diferenciação de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp. 18-24h/37°C
Meio Campylo Sel	Meio seletivo para o isolamento de <i>Campylobacter</i> intestinal (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> principalmente). A presença de sangue de carneiro facilita o crescimento da espécie pesquisada. A fertilidade é aumentada devido à utilização de redutores. Os antibióticos antifúngicos presentes (cefoperazona, vancomicina e anfotericina B) no meio inibem a maior parte dos contaminantes bacterianos e fúngicos.	Isolamento seletivo dos <i>Campylobacter</i> sp. intestinais a partir das fezes. 18-72h/42°C, microaerofilia
chromID Strepto B	Possui 3 substratos cromogênicos que distinguem colônias de <i>Streptococcus</i> do grupo B. Inibição seletiva da maior parte das bactérias que não pertencem à espécie <i>S. agalactiae</i> , assim como leveduras.	Auxílio no rastreio pré natal no isolamento e identificação do <i>S. agalactiae</i> (colônias rosadas). 18-48h/37°C
Meio VCAT	Meio composto por gelose de chocolate, suplemento multivitamínico (PVS), vancomicina, colimicina, anfotericina e trimetoprim, uma mistura que inibe o crescimento da maioria dos bacilos gram negativos e leveduras, mas, com nutrientes que otimizam o crescimento da <i>Neisseria</i> .	Seletivo para isolamento de espécies de <i>Neisseria</i> , principalmente <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> . 18-24h em CO ₂ a 37°C.
Ágar MRS cromogênico	Meio seletivo cromogênico de MRSA que apresenta o crescimento de colônias azuis como resultado da atividade da fosfatase, que está presente em muitos estafilococos. Contém uma combinação de compostos antibacterianos com a função de inibir o crescimento de organismos concorrentes e MASSA, de maneira sensível e específica.	Isolamento e identificação de MRSA (colônias azuis). 18-24h/37°C
Meio cromogênico Carbapenemases	Meio seletivo cromogênico que contém uma formulação modificada de carbapenêmico, sendo utilizado para identificar <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a este fármaco. Colônias rosa	Isolamento seletivo de microrganismos resistentes a carbapenêmicos. 18-24h/37°C

	pálido são presumivelmente positivas para <i>E. coli</i> e colônias azuis para <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i> . Colônias brancas indicam bactérias resistentes, mas não pertencentes à família <i>Enterobacteriaceae</i> .	
--	--	--

2. Valores de referência utilizados na Hematologia

Parâmetro	Valor de Referência	Unidade
Hemoglobina	11,6 - 16,6	g/dL
Eritrócitos	3,92 - 5,65	$\times 10^{12}/L$
Hematócrito	35,5 - 48,6	%
VCM	78,2 - 97,9	fl
HCM	26,5 - 32,6	pg
CHCM	32 - 36,5	g/dL
RDW	11,8 - 16,1	%
Leucócitos	3.400 - 9.600	$\times 10^9/L$
Neutrófilos	1.560 - 6.450 %	$\times 10^9/L$
Eosinófilos	0.030 - 0.480 %	$\times 10^9/L$
Basófilos	0.010 - 0.080 %	$\times 10^9/L$
Linfócitos	0.950 - 3.070 %	$\times 10^9/L$
Monócitos	0.260 - 0.810 %	$\times 10^9/L$
Plaquetas	135 - 371	$\times 10^9/L$
*VGM: Volume Corpuscular médio; HGM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Red cell Distribution Width		
**Autoria própria, baseado no intervalo de valores utilizados no laboratório Unilabs		
***Variações nos valores de referência de acordo com sexo e idade do utente		

Referências Anexos

1 - Fonseca, B. B., Fonseca, L. A. M., & Brito, M. A. V. P. (2004). Adaptação de orientações para elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Boletim Epidemiológico Paulista, 1(8), 7-10.
 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. 2004
 OXOID. ThermoFisher. 2008