

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

RUA DE JORGE VITERBO
FERREIRA N.º 228
4050-313 PORTO - PORTUGAL
WWW.FF.UP.PT



INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

INFECÇÃO DO TRACTO URINÁRIO



João Pedro Néri da Costa Ferreira

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

JOÃO PEDRO NÉRI DA COSTA FERREIRA
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Infeção do Tracto Urinário

**Monografia realizada no âmbito do estágio do
Mestrado em Análises Clínicas**

João Pedro Ferreira. 2014



Monografia realizada por

(João Pedro Neri da Costa Ferreira)

Aluno de estágio do Mestrado em Análises Clínicas

Orientador(a) de monografia

(Prof.^a Doutora Helena Sousa)

Docente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Orientador(a) de estágio

(Dra. Eugénia Flores)

Diretora Técnica do Laboratório R.& S. S.A.

Agradecimentos

O presente trabalho resulta do meu esforço pessoal, em que a colaboração que me foi prestada assumiu um papel importante, por isso, gostaria de aqui expressar o meu reconhecimento e sinceros agradecimentos a todos os que me ajudaram a realizar este objectivo pessoal.

Assim, começaria por agradecer à Professora Dra. Helena Ferreira, a orientadora desta monografia, pela partilha de conhecimentos, pela sua simpatia, dedicação e disponibilidade na elaboração desta monografia. Não me quero esquecer também de expressar o meu agradecimento ao Professor Dr. Franklim Marques pelos conselhos e evidentemente à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na que adorei voltar a ser aluno universitário de novo.

Em segundo lugar, o meu agradecimento à Diretora Técnica, Dra. Eugénia Flores assim como, aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas Rodrigues & Saraiva S.A., que possibilitaram a realização do estudo que deu base a esta tese.

Por último, mas não por isso menos importante, expressar o meu mais sincero agradecimento à minha família e amigos, pelo apoio, amizade e companhia que demonstraram, e que foram fundamentais para a realização desta tese. Obrigado.

Resumo

As infecções do tracto urinário têm uma alta prevalência e incidência, estando associadas a elevados custos económicos directos e indirectos para a comunidade. As estratégias de prevenção actualmente aceites de forma consensual pelas sociedades científicas internacionais provaram ser custo-efectivas.

As ITU afectam cerca de 50% das mulheres em algum momento das suas vidas, sendo a maioria cistites agudas não complicadas e, menos frequentemente, pielonefrites. Consideram-se ITU complicadas, quando afectam crianças, pré-adolescentes, mulheres pós-menopáusicas, grávidas, imunodeficientes, diabéticos ou portadores de uropatias (refluxo vesico-ureteral, disfunção vesical neurogénica, cateteres urológicos).

A resistência aos antibióticos pode ser intrínseca, se a bactéria possuir características estruturais ou enzimáticas que levam à resistência a um determinado antibiótico, ou, na maioria das vezes, adquirida. A resistência adquirida refere-se a quatro grandes tipos de mecanismos, a alteração da permeabilidade ou do local de acção do antibiótico, bombas de efluxo e o mecanismo enzimático da degradação ou inactivação do antibiótico.

O estudo de caso, foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Rodrigues & Saraiva SA, no Sátão, recorrendo-se a um total de 18963 uroculturas no período de 1 de Janeiro de 2010 a 30 de Junho de 2014. Todas as urinas foram semeadas em meio cromogénico (CPS ID 3 BioMérieux®) e incubadas durante 24h a 37°C.

Das 18963 uroculturas analisadas, 2792 foram positivas, sendo que destas, *Escherichia coli* foi o agente predominante (71,5%, n=1658), seguido de *Klebsiella spp.* (10,7%, n=249), *Enterococcus spp.* (7,6%, n=176) e *Proteus mirabilis* (4,1%, n=95).

A identificação bacteriana e o estudo de sensibilidade aos antibióticos foram realizados em 1658 isolados de *Escherichia coli* utilizando o sistema VITEK 2 (BioMérieux®).

No resultado do antibiograma dos antibióticos estudados, apenas o trimetropim/sulfametoxazol e a ciprofloxacina ultrapassaram o limiar de resistência aceitável, (15 – 20 %), enquanto que a fosfomicina e a nitrofurantoína apresentaram o menor limiar de resistência, 2,6% e 2,2%, respectivamente.

Abstract

The urinary tract infections have a high prevalence and incidence, and are associated with high direct and indirect economic costs to the community. Nowadays prevention strategies consensually accepted by the international scientific societies have proven to be cost-effective.

UTI affect about 50% of women at some point in their lives, most of them are uncomplicated acute cystitis and, rarely, pyelonephritis. Complicated UTI cases are considered when it affects children, pre-teens, postmenopausal and pregnant women, immunocompromised, diabetics or patients with obstructive uropathy (vesicoureteral reflux, neurogenic bladder dysfunction, urological catheters).

The antibiotic resistance can be either intrinsic, when the wild bacterial strain has structural or enzymatic features that lead to resistance to a particular antibiotic or, in most cases, acquired resistance. Acquired resistance is due to four major types of mechanisms: the change of permeability, changes on the site of action of the antibiotic, the efflux pumps and the mechanism of enzymatic degradation of the antibiotic.

The study has been developed at the R&S S.A. Laboratories in Sátão, with 18 963 urine cultures in the period from January 1, 2010 to June 30, 2014.

All urine samples were seeded in chromogenic medium (chromID CPS® by BioMérieux®) and incubated for 24h at 37°C. The bacterial identification and antibiotic sensitivity study in 1657 *Escherichia coli* were performed using the VITEK 2 (BioMérieux®) system.

Among the bacterial strains studied in 2792, *Escherichia coli* was the predominant agent (71.5%, n = 1658), followed by *Klebsiella* spp. (10.7%, n = 249), *Enterococcus* spp. (7.6%, n = 176) and *Proteus mirabilis* (4.1%, n = 95).

During the trial only trimethoprim/ sulfamethoxazole and ciprofloxacin exceeded the threshold of acceptable resistance (15 - 20%) while fosfomycin and nitrofurantoin had the lower threshold resistance 2.6 % and 2.2%, respectively.

Lista de abreviaturas e símbolos

ABC - *adenosine triphosphate binding cassette*

AMC - Amoxicilina/Ácido Clavulânico

AmpC - Adenosina Monofosfato Cíclico

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

CIP - Ciprofloxacina

CXM - Cefuroxima

CTX-M - tipo de β -lactamase de espectro alargado

ESBLs - β -lactamases de espectro alargado

EARSS - European Antimicrobial Resistance Surveillance System

ESAC - European Surveillance of Antimicrobial Consumption

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

E. coli - *Escherichia coli*

FOS - Fosfomicina

FT - Nitrofurantoína

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IDSA - *Infectious Disease Society of America*

ITU - Infecção do tracto urinário

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MLS_B - Macrólitos, Lincosamida e Estreptogramina B

MRSA - Methicilin resistente *S. aureus*

MFS - *major facilitator family*

MATE - *multidrug and toxic efflux*

PBP - Proteínas de ligação de penicilina

PAIs - Ilhas de Patogenicidade

R.&S. - Laboratório de Análises Clínicas Rodrigues & Saraiva

RND - *resistance nodulatio division family*

ROS - espécies reactivas de oxigénio

SMR - *small multidrug resistance*

SXT - Trimetropim/Sulfametoxazol

SHV - tipo de β -lactamase de espectro alargado

SCCmec - *staphylococcal cassette chromosome mec*

TEM - tipo de β -lactamase de espectro alargado

TSA - teste de sensibilidade aos antibióticos

UCI - Unidades de Cuidados Intensivos

Índice

1. Estado actual das infecções urinárias.....	12
2. Epidemiologia de infecção urinária	14
3. Etiopatogenia	15
3.1. Factores do hospedeiro	18
3.2. Factores bacterianos	19
4. Classificação das infecções do trato urinário.....	21
5. Cistite aguda não complicada	23
5.1. Diagnóstico	23
5.2. Auto-diagnóstico e diagnóstico por telefone.....	24
5.3. Exame objectivo e testes diagnósticos.....	24
5.4. Normas internacionais de orientação clínica	25
5.5. Tratamento	26
5.6. Resistência bacteriana aos antimicrobianos em isolados urinários	27
6. Pielonefrite aguda na mulher.....	28
6.1. Epidemiologia	28
6.1.1. Microbiologia.....	28
6.1.2. Resistência aos antibióticos	29
6.1.3. Factores de risco	29
6.1.4. Pielonefrite aguda complicada vs não complicada	30
6.2. Diagnóstico clínico	30
6.3. Tratamento em ambulatório ou em internamento.....	33
6.4. Exames de diagnóstico.....	34
6.4.1. Análises de urina.....	34
6.4.2. Urocultura.....	34
6.4.3. Imagiologia	35
6.4.4. Hemoculturas	35
6.4.5. Outros exames de diagnóstico	36
6.5. Escolha dos antibióticos.....	36
6.5.1. Esquemas de terapêutica ambulatoria.....	36
6.6. Monitorização da resposta à terapêutica	37
7. Diagnóstico e tratamento das infecções das vias urinárias nas crianças	38

7.1. Diagnóstico	39
7.1.1. História e exame objectivo	39
7.1.2. Testes diagnóstico.....	39
7.1.3. Diagnóstico diferencial.....	41
7.2. Tratamento	42
7.3. Profilaxia e seguimento	44
8. Resistências em bactérias de Gram-negativo	46
9. Mecanismos de resistência aos antibióticos	48
9.1. Resistência Natural.....	50
9.2. Resistência Adquirida	52
9.2.1. Inactivação enzimática do fármaco	53
9.2.2. Alteração do local de acção dos antibióticos	54
9.2.3. Alteração da permeabilidade e bomba de efluxo.....	55
9.3. Disseminação clonal de estirpes resistentes a antibióticos.....	57
10. Impacto da resistência bacteriana aos antibióticos na sociedade	57
11. Infecções associadas a Cuidados de Saúde	63
11.1. Prevenção de infecções adquiridas no Hospital.....	63
11.2. Infecções Nosocomiais e Relacionadas com Dispositivos	64
11.3. Prevenção da ITU associada à algaliação de curta e média duração	65
12. Estudo de caso.....	66
12.1. Objectivo	66
12.2. Materiais e Métodos	66
12.3. Resultados e Discussão	67
12.3.1. Amostras.....	67
12.3.2. Estudo da susceptibilidade aos antibióticos em isolados de <i>Escherichia coli</i>	68
13. Conclusão.....	73
14. Bibliografia.....	75
15. Anexo: Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas	84
15.1. Resumo	84
15.2. Abstract	84
15.3. Introdução	85
15.4. Fase Pré – Analítica.....	87

15.5. Fase Analítica.....	88
15.5.1. Hematologia	88
15.5.2. Bioquímica clínica.....	101
15.5.3. Imunologia e Endocrinologia.....	107
15.5.4. Microbiologia	124
15.6. Fase Pós - Analítica	130
15.6.1. Controle de Qualidade	130
15.6.2. Validação Biopatológica de resultados.....	134
15.7. Conclusão.....	135
16. Bibliografia.....	136

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de invasão das bactérias uropatogénicas.	21
Figura 2. Transferência horizontal de genes entre bactérias. a) Transformação. b) Transdução. c) Conjugação.....	50
Figura 3. Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	52
Figura 4. Antibióticos afectados pelos diversos mecanismos de resistência das bactérias Gram-Negativo.....	53
Figura 5. Locais de acção e mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias de Gram negativo.....	56
Figura 6. Resistência às fluoroquinolonas em <i>Escherichia coli</i>	59
Figura 7. Resistência combinada às cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
Figura 8. Resistência à metilina em <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figura 9. Microrganismos isolados em uroculturas positivas entre 2010 e 2014	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Espécies bacterianas isoladas com mais frequência	16
Tabela 2. Características dos doentes com infecção das vias urinárias não complicadas e complicadas	23
Tabela 3. Antibióticos para o tratamento da cistite aguda não complicada	26
Tabela 4. Microrganismos responsáveis pela pielonefrite aguda	29
Tabela 5. Manifestações clínicas e laboratoriais em doentes com pielonefrite aguda	31
Tabela 6. Diagnóstico diferencial em doentes com dor lombar e percussão dolorosa do ângulo costovertebral	32
Tabela 7. Complicações da pielonefrite aguda que podem beneficiar com orientação para o especialista	33
Tabela 8. Risco de evolução para sepsis	34
Tabela 9. Opções de tratamento em ambulatório para doentes com pielonefrite	37
Tabela 10. Tratamento antibiótico das infecções do tracto urinário em idade pediátrica	43
Tabela 11. Descrição dos tipos de mutação que podem ocorrer	49
Tabela 12. Resistência intrínseca de algumas bactérias na presença de certos antibióticos	51
Tabela 13. Percentagem de resistência aos antibióticos em diversas bactérias, em Portugal, desde 2003 a 2012	62
Tabela 14. Exemplos de intervenções para prevenir infecções das vias urinárias associadas a cuidados de saúde	64
Tabela 15. Resultados obtidos das uroculturas no período de Janeiro de 2010 a Junho de 2014	67

1. Estado actual das infecções urinárias

A infecção do tracto urinário (ITU) é uma das infecções bacterianas mais frequentes, com elevados custos para a sociedade. Um estudo europeu refere que uma em cada cinco mulheres adultas tem pelo menos um episódio de ITU ao longo da vida (1, 2).

Considera-se infecção urinária, a presença de bactérias em qualquer parte do sistema urinário (rins, ureteres, bexiga), com excepção da uretra, que poderá ser colonizada com flora normal, como os lactobacilos e as neisserias não patogénicas (3).

Os microrganismos podem chegar ao aparelho urinário por via hematogénea ou linfática, mas a via habitual é a ascendente, com origem no reservatório intestinal. Assim se explica que os agentes mais frequentes sejam *Enterobacteriaceae* como a *Escherichia coli* (70% a 90%), *Proteus mirabilis* ou *Klebsiella* spp. Outros agentes gram-positivos como *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus faecalis* são responsáveis pelas restantes infecções (4).

Existem diversos factores que se consideram predisponentes à ocorrência de infecções urinárias, como sejam a estase urinária, a gravidez, a diabetes, a obstrução urinária, os hábitos de higiene inadequados, a inserção de objectos estranhos, as doenças neurológicas e as doenças sexualmente transmissíveis (5).

As mulheres apresentam uma prevalência maior, principalmente devido a factores fisiológicos, como a maior proximidade da uretra feminina com o ânus e o facto de ser uma uretra muito mais curta do que a masculina (6). As crianças, designadamente as do sexo masculino até um ano de idade, também apresentam uma elevada prevalência, nomeadamente de infecção a nível renal, devido ao refluxo vesico ureteral (7). Quando os indivíduos possuem alguma anomalia no aparelho urinário, sobretudo as mulheres, o risco de adquirirem uma infecção urinária pode triplicar (8). Os doentes institucionalizados podem apresentar prevalências elevadas, especialmente associadas à falta de higiene e à algaliação (9).

Os principais sintomas que a infecção urinária provoca são a disúria, polaquiúria, urgência miccional, alterações na cor e no cheiro, dificuldade de iniciar a micção, hematúria, dor na parte inferior do abdómen, calafrios, dor lombar, náuseas e vómitos. A febre só costuma surgir nos casos de pielonefrite. Na cistite a febre é rara e geralmente abaixo dos 38°C. A intensidade e prevalência de sintomas poderão variar entre os indivíduos (10).

As suas características, habitualmente leves e associadas à ausência de complicações, fizeram com que a tomada de decisões terapêuticas fosse geralmente empírica (2, 11). Por esta razão, é de extrema importância que tenhamos o conhecimento sobre as causas que predispõem ou geram essa cistite e os microrganismos relacionados, assim como sobre as resistências dos isolados mais frequentes (12, 13). Sabe-se que existe variabilidade no grau de resistência aos antibióticos entre as várias regiões geográficas e, inclusivamente, dentro destas. Por isso, é importante fazer um tratamento antibiótico racional para evitar o surgimento destas resistências bacterianas responsáveis pelos fracassos terapêuticos, baseado no conhecimento dos microrganismos mais frequentemente associados às ITUs não complicadas e à sensibilidade que estes apresentam aos antibióticos mais utilizados para o seu tratamento na comunidade (2, 11, 14). Desta forma poder-se-á recomendar o tratamento empírico mais adequado, assim como propor e homogeneizar um uso racional dos antibióticos baseado na evidência científica.

Nos Estados Unidos da América (EUA) a incidência de ITU está bem documentada. A ITU motiva mais de 7 milhões de visitas médicas anuais (15, 16) e é responsável por 15% dos antibióticos prescritos em ambulatório (14, 17). Estima-se que mais de metade das mulheres tenha pelo menos uma ITU ao longo da vida e um terço das mulheres sofra o primeiro episódio até aos 24 anos de idade (18).

Se, por um lado, o risco de progressão da cistite para pielonefrite é negligenciável, por outro lado, o potencial de recorrência é elevado. Um estudo de 1990 em jovens universitárias demonstrou, aos seis meses, 27% de recorrência e 3% de segundas recorrências (19). Um estudo mais recente, com mulheres saudáveis, verificou que aos seis meses o risco de recorrência depois de uma primeira ITU é de 25% (20, 21).

Estima-se que nos EUA os custos anuais relacionados com ITU rondem os 1600 milhões de dólares (18). Por todos estes factores, é fundamental que os episódios de ITU sejam correctamente diagnosticados, tratados e prevenidos, tendo em atenção o correcto uso dos antibióticos, de modo a não potenciar o aumento das resistências.

Num estudo realizado em Portugal em 2010, com o objectivo de caracterizar as infecções urinárias e calcular os custos de diagnóstico e terapêutica, concluiu-se que a estimativa do custo médio de um episódio de ITU, em mulheres adultas com infecção urinária recidivante, foi de 162€ por doente (22).

2. Epidemiologia de infecção urinária

A infecção do trato urinário é a terceira infecção mais comum nos humanos ficando atrás somente das infecções respiratórias e gastrointestinais (23) sendo as infecções bacterianas mais frequentes nos cuidados primários.

A cistite aguda apresenta-se, fundamentalmente, em mulheres sem doenças de base e sem anomalias funcionais ou estruturais (24). Estas infecções apresentam uma alta incidência nas mulheres, uma grande proporção das quais terá apresentado um episódio de cistite antes dos 40 anos (25). Estudos têm mostrado que 1 em cada 5 mulheres têm uma infecção urinária em algum momento das suas vidas, confirmando que se trata de um problema extremamente comum em todo o mundo (24).

O pico de incidência de infecções não complicadas do tracto urinário baixo em mulheres observa-se entre os 18 e os 30 anos, coincidindo com a idade de máxima atividade sexual na mulher e também devido à gravidez (24).

É difícil determinar em Portugal a incidência real da ITU adquirida na comunidade. Ainda se torna mais difícil estimar o número de infecções urinárias em mulheres em fase de pós-menopausa. Calcula-se que, aos 70 anos, 15% das mulheres apresentem bacteriúria assintomática, número que aumenta para os 30-40% em idosas hospitalizadas ou internadas em instituições de geriatria e praticamente para os 100% em portadoras de sonda urinária permanente (26).

O risco de recorrência nos seis meses seguintes é maior nas infecções por *Escherichia coli* (27).

A cistite ocorre em 0,3-1,3% das gestações, mas não parece estar relacionado com a bacteriúria assintomática. A pielonefrite aguda ocorre em 1-2% das gestações. As ITU ocorrem em 30-50% dos doentes com transplante renal e, frequentemente, são assintomáticas.

Em 2007, aproximadamente 3,9% das visitas ao consultório estiveram relacionadas com sintomas que envolveram o trato geniturinário. Alguns estudos estimam que as ITU (cistite mais pielonefrite) tenham um custo de pelo menos 1 bilião de dólares por ano. (24)

3. Etiopatogenia

A *E. coli* provoca 70-95% das ITU superior e inferior. São vários os outros organismos responsáveis pelas infecções, incluindo *S. saprophyticus*, espécies de *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacteriaceae*, e fungos. Algumas espécies são mais comuns em determinados subgrupos, como é caso do *Staphylococcus saprophyticus* em mulheres jovens. A maioria das ITU complicadas têm origem nosocomial. Por outro lado, as ITU em doentes de instituições de saúde e nos que têm uma exposição frequente a antibióticos são causadas por estirpes de Gram-negativo multirresistentes, como as produtoras de betalactamases de espectro alargado (ESBL) e as produtoras de carbapenemases. No entanto, a prevalência de estirpes multirresistentes varia de acordo com a área geográfica (24). O factor de risco mais importante para ter bacteriúria é a presença de um catéter. Oitenta por cento das ITU nosocomiais estão relacionadas com o cateterismo uretral, enquanto 5-10% estão relacionadas com a manipulação geniturinária. Os catéteres inoculam os organismos para o interior da bexiga e promovem a colonização fornecendo uma superfície para a adesão de bactérias e causando irritação das mucosas (24).

As ITUs baixas não complicadas comunitárias são causadas por um escasso número de espécies bacterianas e mais de 95% destas são produzidas por uma única espécie (infecção monomicrobiana) (27, 28). A maioria de episódios é produzida por microrganismos aeróbios Gram-negativos provenientes do cólon, ao serem as enterobactérias da flora fecal as que colonizam a zona urogenital. Uma minoria de episódios possui uma etiologia exógena, isto é, são produzidos por microrganismos ambientais com frequência introduzidos nas vias urinárias durante a sua manipulação. Na Tabela 1, observam-se as espécies bacterianas isoladas com maior frequência em uroculturas de doentes com infecção urinária extra-hospitalar, procedentes de um estudo realizado em Portugal no ano de 2008 e de um estudo Europeu, ambos de mulheres com ITU não complicada (26-28).

Tabela 1. Espécies bacterianas isoladas com mais frequência

Espécie ou género	Estudo português (2008)		Estudo europeu (2003)	
	≤ 50 anos (%)	> 50 anos (%)	18-50 anos (%)	51-85 anos (%)
De Gram -				
<i>Escherichia coli</i>	71,7	75,9	77,7	75,3
<i>Proteus mirabilis</i>	7,0	10,2	5,2	9,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,2	3,6	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	2,8	4,0
De Gram +				
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3,7	0,6	4,6	1,2
<i>Enterococcus</i> spp.	2,2	1,8	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,9	0,6	-	-

*(Sensibilidades encontradas de acordo com “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement”; January 2008 (CLSI). Adaptado da referência: (26)

Na mulher jovem sem factores de risco, as cistites agudas são causadas quase exclusivamente por *Escherichia coli* (70-80% dos casos); seguida por *Proteus mirabilis* (5-9%) na mulher jovem sexualmente activa (1, 28-30)

Em relação à patogenia, numa primeira fase, as enterobactérias colonizam o vestíbulo da vulva e a região periuretral. A partir destas localizações, ascende um pequeno número de bactérias até à bexiga e mais excepcionalmente à pélvis e ao parênquima renal. Em circunstâncias normais, estas bactérias são eliminadas pelo fluxo e pelas propriedades antibacterianas da urina e, em menor medida, pela presença de imunoglobulinas A (IgA) e pelos escassos polimorfonucleares presentes na superfície vesical (25, 31). Se essas bactérias não forem eliminadas, iniciar-se-á uma colonização (adesão do microrganismo ao urotélio, proliferação deste e eliminação por micção) ou uma infecção (implica lesão do epitélio vesical) dependendo do equilíbrio entre a virulência da bactéria, o tamanho do inóculo, os mecanismos defensivos locais e a presença ou não de alterações anatómicas ou funcionais do tracto urinário (nesta circunstância, será considerada como sendo ITU complicada). Se não se produzir nenhuma lesão inflamatória da mucosa vesical, então tratar-se-á de uma colonização assintomática, produzindo-se uma bacteriúria

assintomática (31). Quando o microrganismo aderido ao epitélio causa danos tecidulares, que se traduzem no aparecimento de sintomatologia clínica de tipo inflamatório-doloroso, gera-se a cistite (infecção sintomática).

Nem todas as linhagens de *E. coli*, o microrganismo mais bem estudado, têm a mesma capacidade para infectar o aparelho urinário. Só mesmo as linhagens com determinado grau de virulência são capazes de produzir uma infecção em doentes com o aparelho urinário intacto (27). Entre os principais factores de virulência da *E. coli*, destacam-se (20, 31):

- a presença de adesinas que permitem a sua adesão ao urotélio.
- a capacidade de estruturar-se em biopelículas.
- a libertação de toxinas (hemolisinas, factor citotóxico necrotizante).
- as invasinas ou outros elementos codificados em ilhas de patogenicidade (genes responsáveis pelos factores de virulência que se encontram agrupados em fragmentos de DNA muito particulares denominados "ilhas de patogenicidade").

Quantos mais factores de virulência concorrem numa linhagem de *E. coli*, mais virulenta é esta.

Na mulher jovem sem factores de risco, as cistites agudas são causadas quase exclusivamente por *Escherichia coli* (70-80% dos casos) e o maior factor de risco é o coito (27, 31).

Vários factores aumentam o risco de infecção na mulher em fase de pré-menopausa (27, 31):

- o grau de actividade sexual (o maior factor de risco é ter mantido relações sexuais recentes)
- o uso de espermicidas
- atraso na micção pós-coito
- história de ITU recente
- factores genéticos associados à expressão de grupos sanguíneos não secretores

Estudos moleculares têm demonstrado que a maior parte das recorrências detectadas em mulheres jovens são causadas pela mesma estirpe de *E. coli*. A incógnita é saber onde se encontram estas estirpes de *E. coli* entre episódios. Em estudos experimentais, observou-se que as bactérias uropatogénicas invadem as células superficiais da bexiga e criam biofilmes ou colónias. Estas estruturas contêm as bactérias envoltas numa matriz rica em polissacáridos cobertas por uma camada

de uropactina. Estas colónias poderão constituir um novo depósito para os microrganismos causadores das infecções urinárias recorrentes (20, 31).

3.1. Factores do hospedeiro

A obstrução ao fluxo urinário é um factor chave para o aumento da susceptibilidade à ITU. A estase urinária resultante compromete os mecanismos de defesa renais e contribui para o aumento da concentração de bactérias na urina, facilitando a aderência destas às células uroepiteliais (32).

A maior incidência é no sexo feminino, especialmente em mulheres jovens, nas quais, além das causas anatómicas, existem outros factores que aumentam o risco como: relações sexuais mais frequentes, promiscuidade sexual, uso de diafragmas com espermicidas, uso de antibióticos que alteram a flora vaginal e história de ITU na infância. Nas mulheres pós-menopausa os factores fisiológicos e mecânicos que afectam o esvaziamento da bexiga também são factores de risco, incluindo incontinência urinária, cistocelo com volume residual de urina na bexiga, vaginite atrófica, má higiene perineal e história de ITUs recorrentes antes da menopausa. Outros factores são: gravidez, urolitíase, refluxo vesico-ureteral, transplante renal, imunossupressão, manipulação da via urinária, malformações congénitas e doenças metabólicas como diabetes mellitus. Um aspecto muito importante relacionado com a ITU reside na genética, relacionada com a secreção dos antigénios do grupo sanguíneo ABO, que é um factor hereditário autossómico dominante. As mulheres “secretoras” do grupo sanguíneo ABO são mais resistentes à infecção por uropatogénicos. Estudos demonstram que as mulheres “não secretoras” são mais susceptíveis às ITUs recorrentes. Nas mulheres “não secretoras” do grupo sanguíneo ABO, o epitélio vaginal expressa dois receptores glico-esfingolípido que têm afinidade para os uropatogénicos, facilitando desta forma a colonização do tracto urinário pelas bactérias patogénicas (24, 33, 34).

No sexo masculino, a ITU não é uma doença comum, devido à presença de alguns factores protectores, incluindo a distância entre o ânus e o meato urinário e, o meio seco em torno da uretra masculina. O maior comprimento da uretra (12 até 15 cm) e a actividade antibacteriana do fluido prostático também contribuem para que o sexo masculino tenha uma menor frequência de ITU. Alguns comportamentos de risco aumentam a probabilidade dos homens adquirirem ITU, como por exemplo: relações sexuais com mulheres com ITU, homossexualidade e a falta de circuncisão. Entretanto, nenhum destes factores parece aumentar o risco de ITU em jovens saudáveis (25, 35).

O hospedeiro também apresenta mecanismos de defesa na presença de patógenos urinários. O trato urinário é normalmente um meio estéril, com exceção do segmento distal da uretra. É mantido livre de microrganismos pelo fluxo da urina, que é um dos mais importantes mecanismos de defesa contra a proliferação das bactérias que invadem a bexiga, pois estas são eliminadas pela micção. Além disso, a urina normal possui propriedades antibacterianas tais como a alta osmolaridade, a elevada concentração de ureia e de ácidos orgânicos, e o pH ácido. A urina tem também inibidores da aderência bacteriana, entre os quais se destacam a proteína de Tamm-Horsfall, que é uma glicoproteína uromucoide produzida pelas células tubulares da ancha de Henle ascendente, e secretada na urina em altas concentrações (> 30 g/mL). Esta proteína inibe a aderência bacteriana por ser capaz de se ligar à fímbria tipo 1 impedindo a interação com os receptores de uroplaquina. O epitélio urinário produz também peptídeos com acção antimicrobiana, como as defensinas, a catelicidina e as lactoferrinas, que competem com os sideróforos do microrganismo pelo ferro, que é um nutriente essencial para o desenvolvimento das bactérias uropatogénicas. A presença da imunoglobulina do tipo IgA nos fluídos vaginais é também um factor protector, já que esta imunoglobulina se liga às fímbrias tipo1, inibindo a aderência da bactéria ao tecido uroepitelial. Outro mecanismo de defesa na mulher reside na flora vaginal, constituída por *Lactobacillus*, que formam uma barreira que impede a colonização pelos microrganismos uropatogénicos (20, 24, 33, 36).

3.2. Factores bacterianos

Vias de entrada das bactérias uropatogénicas:

Via ascendente. É a principal via responsável pela invasão do trato urinário, ocorrendo em mais de 95% dos casos. A maioria das bactérias que entra no tracto urinário pertence à flora intestinal que coloniza a uretra. Os microrganismos ascendem até a bexiga, podendo atingir os ureteres e ascender até aos rins. Como já mencionado, o comprimento da uretra feminina é de 5 cm e a uretra masculina é de 12–15 cm, isto faz as mulheres mais susceptíveis à ITU. Nesta migração, as bactérias podem invadir o epitélio urinário e causar resposta inflamatória em qualquer nível, o que resulta em diferentes tipos de ITU, de acordo com a localização anatómica. Esta infecção ascendente do trato urinário é um processo complexo, associado à adesão e outras propriedades de virulência da bactéria, à estrutura anatómica, à resposta humoral e aos factores genéticos do hospedeiro (25, 33).

Via hematogénea ou descendente. Trata-se de uma via menos frequente de invasão bacteriana do trato urinário e ocorre em 5% dos casos. Está mais relacionada com as infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, *Candida* spp., *Salmonella* spp. e *Mycobacterium tuberculosis*, que causam infecções primárias em outras partes do corpo, podendo resultar em abscessos focais renais. *Candida albicans* pode causar ITU também pela via ascendente (37).

Via linfática. Actualmente não apresenta muita importância, sendo mais provável uma via linfo-hematogénea, na qual as bactérias podem ser transportadas pelos vasos linfáticos regionais a partir do foco séptico para o conduto torácico, podendo alcançar os rins pela corrente sanguínea (37).

Mecanismo de acção dos agentes uropatogénicos

A interação entre as bactérias infectantes e as células do epitélio urinário é facilitada pelos factores de aderência denominados pili ou fímbrias, das quais existem dois tipos, o pili tipo I (manose sensível) e o pili P (manose resistente). Modelos *in vitro* demonstram a interação de uma adesina situada na extremidade do pili tipo I (ou FimH) com receptores da superfície do lúmen do epitélio vesical conhecidos como uroplaquina. O pili P apresenta-se na maioria das infecções bacterianas em que os agentes patogénicos produzem pielonefrite aguda e reconhece receptores glicolipídicos renais. Os patogénicos urinários como *Escherichia coli*, durante a invasão do tecido, activam vários factores que ajudam a bactéria a aderir à célula epitelial. Uma vez dentro da célula hospedeira, as bactérias multiplicam-se rapidamente formando grupos bacterianos “colónias bacterianas intracelulares” (CBI) que avançam por várias etapas de desenvolvimento e terminam formando os biofilmes bacterianos, que são grupos de bactérias unidas à superfície do epitélio urinário ou entre si. No biofilme, as bactérias desenvolvem um comportamento comunitário que permite a evasão da resposta imune do hospedeiro e da acção dos antibióticos. Assim, as bactérias podem permanecer meses no tracto urinário caracterizando os casos de infecções crónicas ou recorrentes. A *E. coli* também pode formar biofilmes em meios inertes como é o caso das sondas urinárias. Em alguns casos, as bactérias “soltam-se” dos biofilmes e atravessam a membrana celular podendo ligar-se novamente ao epitélio urinário e iniciar uma nova formação de CBI. Durante o processo de patogénese, as bactérias expressam outros mecanismos de virulência como os sideróforos, que são sistemas de captação de ferro, as toxinas como a alfa-hemolisina e o factor necrotizante tipo I (CNF-1). Estes factores ajudam os patogénicos urinários a ter êxito na invasão do tecido,

provocando uma resposta inflamatória urinária, causando ITU ou bacteriúria assintomática (34, 36, 38, 39).

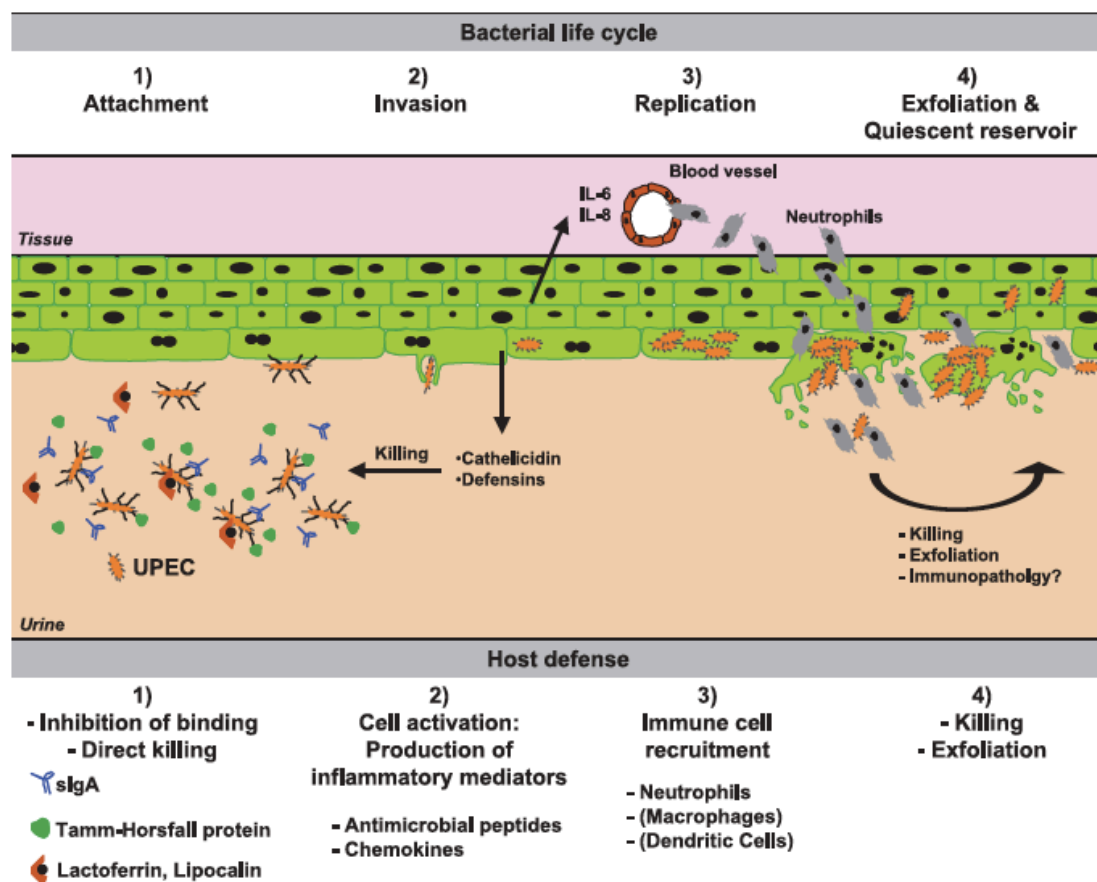


Figura 1. Mecanismos de invasão das bactérias uropatogênicas.

Adaptado da referência: (36)

4. Classificação das infecções do trato urinário

A infecção urinária é classificada tradicionalmente de acordo com o local da infecção e o nível de gravidade. De acordo com o local de infecção classifica-se em infecção do tracto urinário inferior, envolvendo bexiga (cistite), uretra (uretrite) ou próstata (prostatite) e infecções do tracto urinário superior, englobando os ureteres ou o parênquima renal (pielonefrite). De acordo com o grau de severidade, podem ser divididas em ITUs complicadas ou não complicadas.

A ITU não complicada ocorre em pacientes saudáveis cujo tracto urinário apresenta estrutura e função normal. A maioria destes pacientes são mulheres e os microrganismos geralmente são susceptíveis aos antibióticos e erradicados por uma terapêutica de baixo custo. Este tipo de infecção urinária pode ser encontrada nas

seguintes situações: mulher não grávida, ausência de alterações anatómicas do tracto urinário, ausência de alterações funcionais do tracto urinário, ausência de cateteres urinários, ausência de alterações na imunidade. Em geral são infecções adquiridas na comunidade (32, 40).

A ITU complicada está associada a anormalidades anatómicas, funcionais ou metabólicas do tracto urinário que dificultam as defesas naturais. Estas anormalidades podem ser intrínsecas, como exemplo, a hiperplasia benigna prostática (anormalidade intrínseca obstrutiva), as anormalidades congénitas como bexiga neurogénica e fístulas, ou extrínsecas, associadas ao uso de cateteres ou objectos estranhos. As infecções associadas à obstrução por litíase renal são resolvidas após a correção da anormalidade (remoção do cálculo). Uma característica da ITU complicada é a grande variedade de organismos causadores, que são multirresistentes geralmente de origem hospitalar (40, 41).

ITU recorrente é aquela que ocorre com frequência ≥ 3 /ano ou com frequência ≥ 2 episódios nos últimos 6 meses e pode ser classificada em duas categorias:

ITU recidivante - Precoce, ocorre nas primeiras 2 semanas após o final da antibioterapia, sendo o agente etiológico o mesmo da infecção inicial. Habitualmente é resultado de insuficiência do tratamento inicial (antibioterapia inadequada, resistência antibiótica, incumprimento da terapia prescrita) ou por alteração subjacente do aparelho urinário (26).

Reinfecção - Tardia, ocorre após 2 semanas do final do tratamento da ITU inicial, num doente que se encontrava curado, sendo o agente etiológico diferente da IU anterior (geralmente pertencente à flora do tubo digestivo ou da vagina, e menos frequentemente proveniente do parceiro sexual).

Geralmente o agente etiológico das ITU recorrentes é a *E. coli*, todavia na ITU recorrente o tratamento antibiótico deve ter por base a urocultura pré-tratamento, devendo ser comprovada a cura com urocultura pós antibioterapia. (34) (42).

O número de recidivas experimentadas varia de mulher para mulher (variação de 0,3-7,6 episódios por ano). A maioria das infecções recorrentes provêm de bactérias que colonizam os reservatórios fecais ou periuretrais, ocorrendo em 25% das mulheres em qualquer período da sua vida (42).

5. Cistite aguda não complicada

A maioria das ITUs nas mulheres são cistites agudas não complicadas por *Escherichia coli* (70-95%), espécies de *Proteus* ou *Klebsiella*. Outros agentes gram-positivos como *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus faecalis* são responsáveis pelas restantes infecções (1, 24, 37, 43). Embora a cistite aguda não complicada não seja encarada como uma patologia grave, a qualidade de vida dos doentes é muitas vezes seriamente afectada. Uma cistite aguda não complicada pensa-se ser responsável por seis dias de desconforto levando a aproximadamente 7 milhões de consultas médicas por ano acarretando custos aproximadamente de 1,6 mil milhões de dólares (15, 16). Num estudo efectuado em mulheres com cistite aguda não complicada, cerca de metade das participantes referiam que os sintomas lhes causavam perda de dias de trabalho ou faltas escolares (44). Para além disso, até metade das mulheres com cistite aguda não complicada referiam evitar actividade sexual durante pelo menos uma semana.

Tabela 2. Características dos doentes com infecção das vias urinárias não complicadas e complicadas

Não complicadas	Complicadas*
Imunocompetentes	História de infecção das vias urinárias na infância
Sem patologias associadas	Imunodepressão
Sem anomalias urológicas conhecidas	Pré-adolescentes ou pós-menopausa
Não grávidas	Gravidez
Mulher pré-menopausa	Doença metabólica subjacente (por ex., diabetes mellitus)
	Anomalias urológicas (por ex., cálculos, stents, algaliação, bexiga neurogénica, rins poquísticos)

* - As infecções das vias urinárias nos homens são geralmente complicadas.
Adaptado da referência: (45).

5.1. Diagnóstico

A história clínica é o instrumento mais importante para se fazer o diagnóstico de cistite aguda não complicada e deve ser apoiada por um exame objectivo orientado e por uma análise de urina. É igualmente importante excluir ITUs complicadas mais graves. Por definição, o diagnóstico de cistite aguda não complicada consiste numa

infecção urinária numa mulher antes da menopausa, não grávida e sem anomalia urológica ou outra patologia conhecida (Tabela 2) (45).

Os sintomas clássicos da infecção das vias urinárias inferiores incluem disúria, polaquiúria e imperiosidade miccional. Por vezes pode haver hematúria; o desconforto suprapúbico é menos frequente. Quando uma mulher surge com o início agudo de, pelo menos, um dos sintomas clássicos de cistite aguda não complicada, a probabilidade de infecção aumenta 10 vezes para cerca de 50% (16, 46). Assim, a apresentação com um ou mais dos sintomas pode ser considerada como tendo valor de diagnóstico por si própria. Para além disso, a probabilidade de cistite aguda não complicada é menor quando as mulheres referem ter leucorreia vaginal ou irritação, que são mais frequentemente associadas com vaginite ou cervicite. O aparecimento de novo de polaquiúria e disúria, na ausência de leucorreia ou irritação, tem um valor preditivo positivo de IU de 90% (46). Os três principais factores de risco de diagnóstico de IU recorrente em mulheres inclui, o aumento na frequência da actividade sexual, uso de diafragmas com espermicidas e a perda do efeito estrogénico na vagina e na região periuretral (47).

5.2. Auto-diagnóstico e diagnóstico por telefone

As mulheres que tiveram cistite aguda não complicada anteriormente têm geralmente boa precisão a fazer o diagnóstico se têm novo episódio. Num estudo em 172 mulheres com história de IU recorrente, 88 auto-diagnosticaram a IU com base nos sintomas e auto-medicaram-se com antibióticos (48). A avaliação laboratorial mostrou que 84% das amostras de urina mostravam o patogénico urinário, 11% tinham piúria estéril e apenas 5% eram negativas para piúria e bacteriúria. Outro estudo pequeno, aleatorizado e controlado comparou os resultados da cistite aguda não complicada em mulheres saudáveis tratadas com orientação por telefone ou através de ida ao consultório (49). Não se observaram diferenças na pontuação sintomática ou na satisfação. Os autores concluíram que os resultados, no curto prazo, do tratamento da suspeita de cistite aguda com orientação por telefone eram comparáveis aos obtidos com as consultas clássicas.

5.3. Exame objectivo e testes diagnósticos

O exame objectivo de doentes com cistite aguda não complicada é geralmente normal, excepto nos 10 a 20% de mulheres com dor suprapúbica à palpação. A pielonefrite aguda deve ser considerada quando a doente está prostrada e parece

desconfortável sobretudo se tiver concomitantemente febre, taquicardia ou dor à percussão da região lombar.

A facilidade e a relação custo-efetividade dos testes urinários com tiras reagentes faz com que sejam uma alternativa adequada à análise de urina e ao exame microscópico de urina no diagnóstico da cistite aguda não complicada em mulheres sintomáticas (37). Os nitritos e a esterase leucocitária no teste de urina com tiras são os indicadores mais precisos de cistite aguda não complicada. Para se evitar a contaminação, é comum utilizar a porção média do jacto urinário para se fazer o diagnóstico de IU. As uroculturas apenas estão indicadas nas doentes com suspeita de pielonefrite aguda, nas que têm sintomas que não desaparecem ou que recorrem dentro de duas a quatro semanas após terem feito o tratamento e nas doentes que se apresentam com sintomas atípicos (37). Uma contagem de colônias superior ou igual a 10^3 de unidades formadoras de colônias por mL de um patógeno urinário é diagnóstico de cistite aguda não complicada (37). No entanto, vários estudos mostraram que mais de 10^2 unidades formadoras de colônias por mL em mulheres com sintomas típicos de IU representam cultura positiva (50). A análise de urina pós-tratamento ou as uroculturas pós-tratamento em mulheres assintomáticas não são necessárias.

As doentes que surgem com sintomas atípicos de cistite aguda não complicada e as que não respondem de forma adequada ao tratamento com antibióticos apropriados podem necessitar de fazer exames de imagem, como tomografia computadorizada ou ecografia para se excluírem complicações e outras doenças (16).

5.4. Normas internacionais de orientação clínica

Em 2010, um painel de peritos internacionais atualizou as normas orientadoras da *Infectious Disease Society of America* (IDSA) elaboradas em 1999 sobre o tratamento da cistite aguda não complicada e da pielonefrite aguda em mulheres. Este painel fez uma revisão da literatura, incluindo a *Cochrane Database of Systematic Reviews*, e elaborou uma norma orientadora, baseada na evidência, para mulheres com cistite aguda bacteriana não complicada e pielonefrite (51, 52). A IDSA colaborou com a *European Society of Clinical Microbiology* e convidou representantes de várias áreas geográficas e de uma grande variedade de especialidades, incluindo a urologia, ginecologia e obstetrícia, medicina de emergência, médicos de família, medicina interna e doenças infecciosas. Foram determinados níveis de evidência para cada recomendação sobre o uso de antibióticos para o tratamento das IUs não complicadas.

5.5. Tratamento

Em Portugal os estudos existentes sobre ITU realizados na comunidade verificaram altas taxas de resistência da *E. coli* às penicilinas, às quinolonas e ao trimetopim-sulfametoxazol (53, 54). Quanto às cefalosporinas, os estudos apresentam dados discrepantes (53, 54). Nesse sentido em Agosto de 2011, a Direcção Geral de Saúde divulgou uma Norma intitulada “Terapêutica de infecções do aparelho urinário”. Segundo esta Norma, o esquema terapêutico recomendado para o tratamento da cistite aguda não complicada é o que está descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Antibióticos para o tratamento da cistite aguda não complicada

População	Fármaco	Posologia
Cistite aguda não complicada da mulher não grávida	Nitrofurantoína	100mg 6/6 horas durante 5-7 dias
	Fosfomicina	300mg / dia durante 1 dia
	Amoxicilina/ácido clavulânico*	625mg (500+125mg) 8/8 horas durante 5-7dias
Cistite aguda não complicada na mulher grávida	Fosfomicina	3000mg / dia durante 1 dia
	Amoxicilina/ácido clavulânico*	625mg (500+125mg) 8/8 horas durante 5-7dias

* - Antibioterapia alternativa, isto é, se os antibióticos supracitados estiverem indisponíveis ou contraindicados. Adaptado das referências: (26, 37, 51, 55, 56).

A escolha do antibiótico depende da efectividade do agente, dos riscos de efeitos adversos, taxas de resistência e tendência a causarem efeitos colaterais (i.e., efeitos adversos ecológicos da terapêutica com antibióticos que possam tornar os microrganismos resistentes aos fármacos e a colonização ou infecção com organismos resistentes a múltiplos fármacos). Em média, as doentes começam a sentir alívio dos sintomas nas 36 horas depois de terem iniciado o tratamento (42).

A utilização de quinolonas deve ser reservada aos casos com contraindicação ou intolerância reconhecida aos restantes antibióticos, uma vez que têm eficácia menor que outras opções terapêuticas.

A nitrofurantoína deve ser utilizada com precaução em doentes idosos e não deverá ser prescrita quando o pH urinário é superior a 7, por exemplo, nas infeções a *Proteus spp.*

Não há recomendação de utilização de fosfomicina ou de nitrofurantoína em doentes com depuração de creatinina <10 ml/min ou em hemodiálise.

Se há recidiva após tratamento, deve ser utilizado empiricamente um antibiótico de um grupo diferente do utilizado anteriormente, devendo, depois, a terapêutica ser modificada de acordo com a suscetibilidade do agente isolado.

A fosfomicina apresenta maior frequência de efeitos adversos, designadamente diarreia, mas melhor atividade contra agentes Gram-positivos.

Em indivíduos do sexo masculino, na ausência de prostatite, o tratamento deve ter a duração de 7-10 dias (56).

As novas evidências apoiam a utilização de nitrofurantoína e da fosfomicina como terapêutica de primeira linha nas seguintes dosagens: 1) nitrofurantoína na dose de 100mg 6/6 horas durante 5-7 dias; 2) fosfomicina na dose de 300mg / dia durante 1 dia e 3) amoxicilina/ácido clavulânico em dose de 625mg (500+125mg) 8/8 horas durante 5-7 dias em antibioterapia alternativa (56).

Apesar de largamente utilizados no tratamento das IUs, os sumos de arando (cranberry), apresentam resultados controversos em doentes sintomáticas (57).

5.6. Resistência bacteriana aos antimicrobianos em isolados urinários

Em Portugal os antibióticos betalactâmicos não estão indicados como terapêutica de primeira linha na cistite aguda não complicada devido às taxas de *E coli* resistentes serem, em muitas zonas, superiores a 20%. A resistência às fluoroquinolonas geralmente situa-se abaixo dos 10% na América do Norte e na Europa, mas há uma tendência para taxas de resistência mais elevadas ao longo dos últimos anos (51). Em Portugal, as fluoroquinolonas apresentam uma taxa de resistências muito elevada, cerca de 30%. Para se preservar a eficácia das fluoroquinolonas, não são recomendadas como fármacos de primeira linha. A fosfomicina e a nitrofurantoína têm mantido taxas elevadas de actividade *in vitro* na maior parte das áreas (51).

Dado que os resultados das uroculturas não são publicados por rotina, quando se trata casos de cistite aguda não complicada, as taxas de resistência local podem não estar disponíveis. A incapacidade dos hospitais publicarem anualmente os dados de sensibilidade antimicrobiana, pode causar taxas de resistência visto que a terapêutica instituída pode não ter em conta a realidade local no que respeita à

cistite aguda não complicada (por ex., doentes mais graves, internadas, de todas as idades, homens). Foram publicados vários estudos que podem ajudar a prever a possibilidade de resistência da *E coli* ao trimetoprim/sulfametoxazol em doentes com cistite aguda não complicada. A utilização de trimetoprim/sulfametoxazol nos últimos 3 a 6 meses tem sido considerada um factor de risco independente para resistência em mulheres com cistite aguda não complicada (58, 59). Para além disso, dois estudos efectuados nos EUA mostraram que ter viajado para fora dos EUA nos três a seis meses anteriores se associava de forma independente com resistência ao trimetoprim/sulfametoxazol (15, 60).

6. Pielonefrite aguda na mulher

A pielonefrite aguda é uma das mais graves infecções bacterianas das mulheres adultas jovens.

6.1. Epidemiologia

Por definição, a pielonefrite aguda é uma infecção das vias urinárias e do rim que geralmente é consequência de uma infecção bacteriana ascendente através dos ureteres desde a bexiga até aos rins. Calcula-se que a pielonefrite aguda seja a causa de 250.000 consultas anuais e 200.000 internamentos todos os anos nos EUA. Em um estudo epidemiológico de pielonefrite aguda nos Estados Unidos encontraram taxas anuais globais de 15-17 casos por cada 10.000 mulheres e 3-4 casos por cada 10.000 homens. O custo do tratamento de pielonefrite aguda foi estimado em 2,14 biliões de dólares por ano (61). A incidência de pielonefrite aguda é mais elevada nas mulheres saudáveis dos 15 aos 29 anos, seguido pelos lactentes e pessoas mais idosas (62). Apesar da pielonefrite aguda também ocorrer em homens, crianças e mulheres grávidas, estes grupos são apenas responsáveis por uma pequena percentagem de casos.

6.1.1. Microbiologia

Em 80% dos casos de pielonefrite aguda, a *Escherichia coli* é o agente patogénico responsável nas mulheres, embora não seja tão frequente nas pessoas mais velhas. A seguir à *E coli* surgem outros agentes menos frequentes, em que incluem as Enterobacteriaceas, *Pseudomonas aeruginosa*, estreptococos do grupo B e os enterococos. O espectro de patogénicos envolvidos na pielonefrite aguda é semelhante ao da cistite, mas com uma menor frequência de *Staphylococcus saprophyticus* (Tabela 4).

Tabela 4. Microrganismos responsáveis pela pielonefrite aguda

Microrganismo	Prevalência (%)
<i>Escherichia coli</i>	82 (mulher) 73 (homem)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,7 (mulher) 6,2 (homem)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	< 3 (mulher)
Espécies de <i>Candida</i>	Raro
Espécies de <i>Enterococcus</i>	Raro
Outras <i>Enterobacteriaceae</i> (ex., espécies de <i>Proteus</i> , espécies de <i>Enterobacter</i>)	Raro
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Raro
Espécies de <i>Ureoplasma</i>	Raro

Adaptado da referência: (62)

6.1.2. Resistência aos antibióticos

Ao longo da última década, as bactérias adquiridas na comunidade (especialmente *E coli*) que produzem betalactamases de espectro alargado têm emergido como causa de pielonefrite aguda em todo o mundo. Os factores de risco mais frequentes para contraírem estes patogénicos urinários incluem visitas a centros de cuidados médicos, a utilização recente de antibióticos (particularmente cefalosporinas e fluoroquinolonas), idade avançada e a presença de patologias associadas, como a diabetes mellitus e infecções urinárias recidivantes (IUs) (63-66).

6.1.3. Factores de risco

Os factores de risco de pielonefrite aguda nas mulheres não grávidas incluem as relações sexuais três ou mais vezes por semana nos últimos 30 dias, IUs nos últimos 12 meses, diabetes mellitus, incontinência de esforço nos últimos 30 dias, novo parceiro sexual no último ano, utilização de espermicida recentemente e história de IUs na mãe (62, 67).

As mulheres mais velhas, as que estão em menopausa ou as grávidas e as que têm anomalias estruturais das vias urinárias preexistentes ou obstrução têm maior risco de IU, mas não necessariamente de pielonefrite aguda (63, 68).

6.1.4. Pielonefrite aguda complicada vs não complicada

A pielonefrite aguda não complicada surge caracteristicamente em mulheres saudáveis, jovens sem alterações estruturais ou funcionais das vias urinárias e sem patologia significativa associada. A pielonefrite aguda complicada surge em doentes com alterações estruturais ou funcionais das vias urinárias ou com condição médica predisponente. Comparada com a pielonefrite aguda não complicada, a pielonefrite aguda complicada caracteriza-se por um espectro de apresentações clínicas mais vasto, uma maior variedade de organismos infectantes (incluindo uma maior probabilidade de resistência aos antibióticos) e um maior risco de progressão para uma complicação, como abscesso intrarrenal ou perirrenal ou pielonefrite enfisematosa (69, 70).

6.2. Diagnóstico clínico

A história e o exame objectivo são os instrumentos mais importantes para se fazer o diagnóstico de pielonefrite aguda (Tabela 5)(71). Os médicos devem considerar a possibilidade de diagnóstico de pielonefrite aguda nas mulheres que apresentam sintomas das vias urinárias inferiores (por ex., polaquiúria, urgência miccional e disúria) acompanhados por febre, náuseas, vômitos ou dor lombar. A dor lombar está quase universalmente presente nos doentes com pielonefrite aguda, a sua ausência deve fazer pensar em diagnósticos alternativos. No exame objectivo, o elemento chave é a dor despertada pela percussão do ângulo costovertebral. Os doentes com nefrolitíase ou ureterolitíase, que também são causa de dor lombar, não se apresentam geralmente com dor despertada pela percussão do ângulo costovertebral.

Febre acima de 38°C é característica da pielonefrite aguda, mas pode não existir em pessoas com pielonefrite aguda ligeira ou em fase inicial. A febre pode igualmente não existir em indivíduos idosos, fragilizados ou em doentes imunodeprimidos que podem não apresentar outras manifestações clássicas de pielonefrite aguda.

Tabela 5. Manifestações clínicas e laboratoriais em doentes com pielonefrite aguda

Categoria	Manifestações
História	Sintomas das vias urinárias inferiores (por ex., polaquiúria, urgência miccional e disúria) Sintomas das vias urinárias superiores (por ex., dor lombar) Sintomas constitucionais (por ex., febre, calafrios, mal-estar) Sintomas gastrointestinais (por ex., náuseas, vômitos, anorexia, dor abdominal)
Exame objectivo	Febre (temperatura > 38,0°C), taquicardia, hipotensão Dor à percussão do ângulo costovertebral Possível dor abdominal ou suprapúbica
Exames laboratoriais	Análise de urina mostrando positividade no teste da esterase leucocitária, piúria microscópica ou hematúria ou cilindros de leucócitos Esfregaço do sangue periférico revelando leucocitose, com ou sem desvio esquerdo Hemoculturas positivas em 15 a 30% dos casos Crescimento na urocultura de $\geq 10^5$ unidades formadoras de colónias por mL de urina

Adaptado da referência: (71)

Os médicos devem equacionar outras hipóteses de diagnóstico que podem ter formas semelhantes às da apresentação da pielonefrite aguda ou ser sua consequência (Tabela 6).

Tabela 6. Diagnóstico diferencial em doentes com dor lombar e percussão dolorosa do ângulo costovertebral

Doença	Dor lombar*	Dor à percussão do ângulo costovertebral*	Febre e leucocitose*
Abcesso abdominal	+/-	+/-	+
Abdómen agudo	+/-	+/-	+/-
Pielonefrite aguda	+	+	+
Apendicite	+/-	+/-	+/-
Processos da base da pleura	+	-	-
Diverticulite	+/-	-	+
Endometriose	+/-	+/-	-
Fractura de costelas inferiores	+	+	+
Doença metastizada	+/-	+/-	-
Perturbações musculoesqueléticas	+/-	+/-	-
Nefrolitíase	+	+	-
Perturbações renais não infecciosas (incluindo litíase urinária)	+/-	+/-	-
Pancreatite	+/-	+/-	+
Necrose papilar	+	-	-
Doença inflamatória pélvica	+/-	-	+/-
Enfartes pulmonares	+/-	-	-
Necrose corticomedular renal	+	-	-
Trombose da veia renal	+	-	-
Doenças retroperitoneais (ex., hemorragias, abscessos)	+/-	+/-	+/-
Varicela (shingles)	+	+	-
Abcesso ou enfarte esplénico	+	+	+/-
Obstrução das vias urinárias	+	+/-	-
Patologia vascular	+	-	-

* Manifestação habitualmente presente (+), habitualmente ausente (-), ou presente variavelmente (+/-). Adaptado da referência: (71).

Os abscessos intrarrenais e perirrenais, que frequentemente são complicação da pielonefrite aguda, são mais frequentes do que a pielonefrite enfisematosa, que é uma infecção necrosante que leva ao aparecimento de gás intraparenquimatoso renal identificável pela imagiologia renal (72). Esta doença surge mais frequentemente em mulheres idosas com diabetes. Complicações adicionais da pielonefrite aguda que podem beneficiar da consulta a especialistas de urologia ou de doenças infecciosas estão enumeradas no Tabela 7.

O tratamento prévio com antibióticos, se bem que não relevante sob o ponto de vista diagnóstico, deve ser considerado quando se escolhe um esquema de tratamento. Por isso, deve ser incluído na história do doente quando se está perante uma suspeita de pielonefrite aguda.

Tabela 7. Complicações da pielonefrite aguda que podem beneficiar com orientação para o especialista

Complicação	Testes diagnósticos importantes	Sub-especialidade indicada
Bacteriemia associada com algaliação	Hemoculturas, testes de sensibilidade aos antibióticos	Doenças infecciosas
Pielonefrite enfisematosa	Imagiologia das vias urinárias	Doenças infecciosas, radiologia de intervenção, urologia
Microrganismo com vastas resistências a fármacos	Hemoculturas, uroculturas, teste de sensibilidade a antibióticos	Doenças infecciosas
Abcesso perinefrítico ou intrarrenal	Imagiologia das vias urinárias	Radiologia de intervenção, urologia
Obstrução urinária	Imagiologia das vias urinárias	Radiologia de intervenção, urologia

Adaptado da referência: (73)

6.3. Tratamento em ambulatório ou em internamento

A maioria dos casos de pielonefrite aguda não complicada pode ser tratada em ambulatório. No entanto, os doentes que parecem mais graves podem ter pielonefrite grave ou uma complicação da pielonefrite aguda e devem ser internados

para avaliação complementar (Tabela 8). Neste doentes deve ser considerada a possibilidade de obstrução das vias urinárias ou um diagnóstico alternativo (73).

Tabela 8. Risco de evolução para sepsis

- Patologias associadas (por ex., disfunção renal, patologia urinária, diabetes mellitus, doença hepática ou cardíaca avançada)
- Instabilidade hemodinâmica *
- Sexo masculino
- Disfunção metabólica (por ex., disfunção renal, acidose)
- Gravidez
- Dor abdominal ou do flanco de grande intensidade
- Aspecto tóxico
- Incapacidade de ingerir líquidos pela boca
- Febre muito elevada (> 39,4°C)

Adaptado da referência: (73)

6.4. Exames de diagnóstico

6.4.1. Análises de urina

O teste de urina com tiras reagentes, o exame microscópico da urina, ou ambos, são utilizados com frequência no diagnóstico de IU, incluindo a pielonefrite aguda. A maior parte das mulheres com pielonefrite aguda têm piúria marcada ou um teste de esterase leucocitária positivo, muitas vezes acompanhado de hematúria microscópica ou presença de hemoglobina no teste com tiras. Pelo contrário, é rara a presença de hematúria macroscópica nos doentes com pielonefrite aguda e é mais frequente nos doentes com cistite aguda não complicada. A presença de cilindros leucocitários indica a origem renal da piúria, apoiando o diagnóstico de pielonefrite aguda, mas este achado nem sempre está presente (71).

6.4.2. Urocultura

Qualquer doente em que se suspeite de pielonefrite aguda deve fazer uma urocultura e uma prova de sensibilidade aos antibióticos para se ajustar o possível tratamento antibiótico (se não houver melhoria) e ajudar na selecção do antibiótico oral nos doentes inicialmente tratados com antibióticos endovenosos (51).

Uma amostra do jacto médio de urina depois de uma limpeza adequada da vulva é o que se recomenda frequentemente.

Mais de 95% das mulheres com pielonefrite aguda não complicada têm mais de 10^5 unidades formadoras de colônias de um único microrganismo gram negativo por mL de urina (73). A coloração Gram da urina, se disponível, pode ajudar na escolha da terapêutica empírica enquanto se aguardam os resultados das culturas. Se forem detectados cocos gram positivos, as espécies de *Enterococcus* ou o *S. saprophyticus* podem ser o organismo implicado (51).

As análises de urina e as uroculturas pós-tratamento são desnecessárias nas doentes que ficam assintomáticas depois do tratamento. No entanto, é aconselhável repetir a urocultura se os sintomas não tiverem melhoria substancial dois a três dias depois de iniciada a terapêutica ou se os sintomas reaparecerem nas duas semanas seguintes à terapêutica. Estas doentes devem igualmente fazer uma avaliação imagiológica das vias urinárias.

6.4.3. Imagiologia

A maioria das mulheres com pielonefrite aguda não necessita de estudos imagiológicos, a menos que os sintomas não melhorem ou haja uma recidiva (74). O objectivo dos estudos de imagem é identificar uma anomalia estrutural subjacente, como uma obstrução oculta decorrente da presença de um cálculo ou um abscesso (74, 75). Embora a ecografia e a ressonância magnética renal sejam por vezes utilizadas, a tomografia computadorizada com o contraste é considerada o meio diagnóstico de escolha em mulheres não grávidas.

Devido ao risco da nefropatia por contraste, deve ser-se cauteloso quando se administra contraste a doentes medicados com metformina ou nos que têm insuficiência renal. No entanto, os doentes com pielonefrite aguda e uma elevação aguda dos níveis basais de creatinina podem algumas vezes necessitar de fazer uma tomografia computadorizada como parte da avaliação para se excluir obstrução (76).

6.4.4. Hemoculturas

As hemoculturas são frequentemente realizadas em doentes com pielonefrite aguda que estão suficientemente mal para terem sido internados, embora geralmente não sejam necessárias nos casos de pielonefrite aguda não complicada (77). Cerca de 12 a 20% dos doentes com pielonefrite aguda têm bacteriemia, os indivíduos mais velhos e os que têm pielonefrite aguda complicada têm maior probabilidade de terem sépsis e bacteriemia (71).

Atendendo a que a urocultura quase sempre mostra um agente infeccioso nas mulheres que têm pielonefrite aguda, a hemocultura torna-se um exame redundante.

Contudo, as hemoculturas podem ser o único método capaz de identificar o microrganismo causal em casos de suspeita de pielonefrite aguda que vêm a mostrar ser outra doença, como endometrite, abscesso do músculo psoas ou intrabdominal ou colangite.

Não há qualquer evidência que mostre que os doentes com hemoculturas positivas devam ser tratados de forma diferente dos que têm hemoculturas negativas no que respeita ao agente, via ou duração da terapêutica com antibióticos, internamento ou duração do internamento (se admitido no hospital).

6.4.5. Outros exames de diagnóstico

A avaliação inicial da pielonefrite aguda deve incluir um estudo metabólico basal, sobretudo para avaliar a função renal. Se o diagnóstico não for evidente, podem estar indicados outros exames auxiliares (por ex., níveis de lípase, transaminases e subunidade beta da gonodotrofina coriônica humana) para se fazer o diagnóstico diferencial (73).

6.5. Escolha dos antibióticos

Em 2010, a *Infectious Disease Society* actualizou as suas normas de tratamento da cistite aguda não complicada e pielonefrite na mulher elaboradas em 1999 (51). As normas incluíram recomendações para esquemas de antibióticos em doentes com pielonefrite aguda.

Em Portugal, segundo a Norma da DGS nº 015/2011, na pielonefrite, como na cistite, as quinolonas não são terapêutica empírica recomendada, uma vez que promovem frequentemente a seleção de bactérias corresponsáveis a diferentes antimicrobianos e que as taxas de resistência às quinolonas de agentes patogénicos frequentes são muito elevadas em Portugal (30%).

Quando se escolhe um antibiótico, os médicos devem ter em conta a sua efectividade, o risco de efeitos adversos e as taxas de resistência na comunidade local. Independentemente do antibiótico que se escolher para início de terapêutica empírica, o esquema deve ser revisto, se necessário, logo que os resultados dos testes de sensibilidade estejam disponíveis.

6.5.1. Esquemas de terapêutica ambulatoria

Segundo a norma portuguesa da DGS deve-se optar pelo seguinte esquema terapêutico; em casos ligeiros a moderados de pielonefrite, os doentes podem ser medicados com ceftriaxona 1 gr IV ou IM (1 toma) seguido de cefuroxima – axetil 500 mg 12/12h *per os*, *durante* 7-14 dias; em casos ligeiros a moderados em doentes intolerantes aos beta-lactâmicos, os doentes podem ser tratados com

levofloxacina 750 mg/dia durante 5 dias; em casos graves de pielonefrite (com sepsis) é recomendado o uso de ceftriaxona 2 g/dia IV ou IM, tendo a duração uma decisão em meio hospitalar; em casos graves de pielonefrite em doentes intolerantes aos beta-lactâmicos recomenda-se o uso de gentamicina seguido de antibioterapia dirigida por antibiograma (5 mg/Kg/dia IV). A Tabela 9 resume as opções de tratamento em ambulatório dos doentes com pielonefrite (51, 56).

Dada a elevada taxa de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos orais e ao trimetoprim/sulfametoxazol, estes agentes geralmente são reservados para os casos em que os resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos são conhecidos e indicam actividade provável (51, 56).

6.6. Monitorização da resposta à terapêutica

A terapêutica empírica adequada deve causar melhoria nas 48 a 72 horas seguintes a ser iniciada. Se a doente não melhorar como seria de esperar (i.e., não existe diminuição ou desaparecimento progressivo dos sintomas e sinais locais e sistémicos que levaram ao diagnóstico), deve considerar-se fortemente a possibilidade de uma complicação da pielonefrite aguda ou um diagnóstico alternativo e devem fazer-se os exames auxiliares indicados (51).

Tabela 9. Opções de tratamento em ambulatório para doentes com pielonefrite

População	Antibióticos	Posologia
Pielonefrite - casos ligeiros a moderados	Ceftriaxona seguido de Cefuroxima – axetil	1 gr IV ou IM (1 toma) 500 mg 12/12h durante 7-14 dias
Pielonefrite - casos ligeiros a moderados em doentes intolerantes aos beta-lactâmicos	Levofloxacina	750mg / dia durante 5 dias
Pielonefrite – casos graves (com sépsis)	Ceftriaxona	2g/dia IV ou IM. Duração: Decisão em meio hospitalar
Pielonefrite - casos graves em doentes intolerantes aos beta-lactâmicos	Gentamicina seguido de antibioterapia dirigida por antibiograma	5mg/kg/dia IV. Duração: Decisão em meio hospitalar

Adaptado da referência: (56)

7. Diagnóstico e tratamento das infecções das vias urinárias nas crianças

As IUs agudas são relativamente frequentes nas crianças. Pelos sete anos de idade, 8% das raparigas e 2% dos rapazes tiveram pelo menos um episódio (78).

Estima-se uma maior incidência anual no primeiro ano de vida no sexo masculino (1% vs 0,8%) com uma incidência acumulada até aos 16 anos maior no sexo feminino (11,3% vs 3,6%). As crianças de raça caucasiana apresentam uma prevalência de ITU superior às de raça negra (79).

Num estudo de lactentes, com apresentação nos serviços de urgência pediátrica, a prevalência de IUs em lactentes com menos de 60 dias de vida e que têm febre superior a 38°C foi de 9% (80).

De acordo com a Norma 008/2012 da Direcção-Geral da Saúde relativa ao diagnóstico e tratamento da infecção do tracto urinário em idade pediátrica, a análise laboratorial de urina é obrigatória, sempre que haja a suspeita clínica de ITU:

- a) nas crianças de idade inferior ou igual a 24 meses com febre, sem foco;
- b) nas crianças com idade superior a 24 meses e com sintomatologia sugestiva de ITU, nomeadamente febre e dor abdominal ou lombar, disúria, polaquiúria, hematúria ou incontinência urinária de início recente.

É considerado significativo o crescimento de: ≥ 1 UFC/ml por PSP; $> 10^4$ - 10^5 UFC/ml por algaliação; $> 10^5$ UFC/ml por jacto médio. Em determinadas circunstâncias uma urocultura negativa não exclui a presença de ITU, em caso de: antibioterapia sistémica prévia; uso de soluções antissépticas para limpeza dos genitais, poliúria.

Os critérios que a Academia Americana de Pediatria (AAP) utiliza para o diagnóstico de ITU em crianças de 2-24 meses são a presença de piúria e/ ou bacteriúria no exame de urina e por uma contagem de pelo menos 50 mil unidades formadoras de colónias (UFC) por ml ($\geq 5 \times 10^4$ cfu/mL) em amostras obtidas por cateter (81).

De acordo com a Associação Europeia de Urologia, para o diagnóstico de ITU, sugere a cultura de urina asséptica, do meio da micção, com mais de 10^4 UFC/ml em doentes sintomáticos, ou uma contagem de mais de 10^5 UFC/ml em doentes assintomáticos (37).

Na população pediátrica portuguesa, o principal agente etiológico de ITU é a *E. coli* com uma prevalência variável em diversos hospitais do país entre 53% e 81% com taxas de resistência à ampicilina entre 44,8% e 54,9%, à amoxicilina/ac.clavulânico entre 5,7% e 21,7%, ao cefuroxime entre 1,2% e 4%, à nitrofurantoína entre 1% e

4,7% e ao TMP/SMX entre 19% e 31,3% (dados recolhidos junto dos serviços de microbiologia dos seguintes hospitais: Centro Hospitalar S. João, Centro Hospitalar do Porto, Hospital Pediátrico de Coimbra, Hospital de Santa Maria, Hospital de Dona Estefânia).

Uma revisão sistemática mostrou que defeitos do parênquima renal são detectados em 15% das crianças um ou dois anos depois de lhes ter sido feito o primeiro diagnóstico de IU (82). As complicações a longo prazo das IUs associadas com cicatrizes renais incluem hipertensão arterial, insuficiência renal crónica e toxemia na gravidez. As crianças com pielonefrite podem desenvolver inflamação focal dos rins (pielonefrite focal) ou abscesso renal. Qualquer inflamação do parênquima renal pode conduzir à formação de cicatriz renal. Aproximadamente 10-30% das crianças com ITU desenvolve cicatriz renal. No entanto, o grau de cicatrização necessário para o desenvolvimento de sequelas a longo prazo ainda é desconhecido (83).

7.1. Diagnóstico

7.1.1. História e exame objectivo

Os sinais clínicos e os sintomas de IU dependem da idade da criança. Os recém-nascidos com IU podem apresentar icterícia, sépsis, má progressão do crescimento, vómitos ou febre. Nos lactentes e crianças mais pequenas, os sinais e sintomas típicos incluem febre, urina com mau cheiro, hematúria, dor abdominal ou nos flancos e incontinência urinária de início de novo. As crianças em idade escolar podem ter sintomas semelhantes aos que surgem em adultos, incluindo disúria, polaquiúria ou urgência miccional. Os rapazes têm risco aumentado de IU se tiverem menos de seis meses ou menos de 12 e não circuncidados. As raparigas têm geralmente risco mais elevado de IU, particularmente se tiverem menos de um ano (84). Os achados do exame objectivo podem ser inespecíficos, mas pode haver dor à palpação da região suprapúbica ou do ângulo costovertebral.

7.1.2. Testes diagnóstico

Os testes com tiras para as IUs incluem a pesquisa de esterase leucocitária, nitritos, sangue e proteínas. A esterase leucocitária é o teste isolado mais sensível para uma criança com suspeita de IU. O teste de nitritos é mais específico, mas menos sensível. Um resultado negativo no teste da esterase leucocitária reduz muito a probabilidade de IU, enquanto que um teste de nitritos positivo a torna mais provável, o contrário, porém, não é verdadeiro. Os testes de tiras para sangue e proteínas têm baixa sensibilidade e especificidade na detecção da IU e podem gerar

confusões. A precisão dos achados positivos é como se indica de seguida (assumir uma probabilidade de pré-teste de 10%) (81, 85):

- Nitritos: 53% de sensibilidade, 98% de especificidade, 75% de probabilidade de IU
- Bacteriúria no exame microscópico: 81% de sensibilidade, 83% de especificidade, 35% de probabilidade de IU
- Leucocitúria no exame microscópico: 73% de sensibilidade, 81% de especificidade, 30% de probabilidade de IU
- Esterase leucocitária: 83% de sensibilidade, 78% de especificidade, 30% de probabilidade de IU
- Esterase leucocitária ou nitritos: 93% de sensibilidade, 72% de especificidade, 27% de probabilidade de IU
- Sangue: 47% de sensibilidade, 78% de especificidade, 19% de probabilidade de IU
- Proteínas: 50% de sensibilidade, 76% de especificidade, 19% de probabilidade de IU

Todas as crianças febris dos dois aos 24 meses de idade sem uma causa óbvia de infecção devem ser avaliadas relativamente a terem uma IU, com excepção dos rapazes circuncidados com mais de 12 meses (81, 84, 86). As crianças mais velhas devem ser avaliadas se houver clínica que aponte para uma infecção urinária como possível causa. O *National Institute for Health and Clinical Excellence* no Reino Unido recomenda a incorporação de estratégias específicas de testes de urina com base na idade dos doentes (87). Neste modelo, a urocultura e o exame microscópico devem ser efectuadas nas crianças com menos de três anos de idade em vez do exame com tiras de teste. A presença de piúria com mais de 5 leucócitos por campo de alta resolução e bacteriúria são recomendadas como critérios para diagnosticar IU com microscópio (37). Nas crianças jovens, as amostras de urina colhidas com saco não são fiáveis comparativamente às colhidas com algália (88).

Segundo a Norma portuguesa 008/2012 da DGS, se uma análise de urina colhida por técnica não invasiva (saco coletor) apresentar alterações na tira-teste urinária ou sedimento urinário é obrigatório efectuar a nova colheita de urina por algaliação ou punção suprapúbica para confirmação da ITU.

Recomenda-se não ultrapassar uma hora para o processamento da urina, em temperatura ambiente. Se não for possível processar a urina neste intervalo de tempo, deve ser refrigerada após colheita, a temperatura entre 2-8° C e até 4 horas.

As técnicas de imagem mais bem classificadas pelos Critérios de Adequação do *American College of Radiology* para avaliação adicional de crianças com IU são: a ecografia renal e vesical, a cistografia isotópica (radionuclídeos) ou a cisto-uretrografia miccional e pós-miccional e a cintigrafia renal (89). A ecografia renal e vesical é efectiva na avaliação da anatomia, mas não consegue detectar o refluxo vesicoureteral. A cistografia isotópica ou a cisto-uretrografia miccional e pós-miccional é eficaz para o rastreio e classificação do refluxo vesicoureteral, mas envolve a exposição a radiação e algaliação. Se bem que a cisto-uretrografia miccional e pós-miccional seja sugerida tanto para raparigas como para rapazes, a cistografia de radionuclídeos é apenas proposta para raparigas porque a cisto-uretrografia é necessária para se obter uma imagem adequada da anatomia da uretra e da bexiga em rapazes. Uma cintigrafia cortical renal (também designada cintigrafia ou DMSA) usa tecnécio e é eficaz para avaliar cicatrizes renais, mas necessita de injeção intravenosa de radioisótopo.

Segundo as guidelines da *American Academy of Pediatrics* baseadas em estudos observacionais e opiniões de especialistas recomendam a ecografia renal e vesical na rotina depois de uma primeira ITU febril em crianças dos 2-24 meses. Uma estratégia de imagem opcional para crianças febris com IU, especialmente para crianças com mais de três anos, é fazer primeiro uma ecografia e uma cintigrafia cortical renal. Esta estratégia evita a algaliação com cistografia e minimiza a exposição a radiações se os resultados da cintigrafia forem normais. No entanto, se for encontrada cicatriz renal ou pielonefrite na cintigrafia, a cistografia está indicada (89-91).

7.1.3. Diagnóstico diferencial

Se bem que a febre possa ser a única manifestação na altura da apresentação em crianças com menos de 24 meses, os achados físicos do exame objectivo podem sugerir diagnósticos diferentes, incluindo otite média, gastroenterite ou infecção das vias aéreas superiores. A bacteriemia oculta deve também ser sempre considerada como uma possibilidade, se bem que a probabilidade deste diagnóstico seja muito inferior ao de IU (menos de 1 *versus* 7%) em crianças com as vacinas em dia e sem outras fontes de infecção identificáveis no exame objectivo. Cálculos urinários, uretrite (incluindo doenças sexualmente transmissíveis), dificuldades de micção e diabetes mellitus devem ser consideradas em crianças com problemas das vias urinárias (90).

7.2. Tratamento

Deve ser iniciado o mais precocemente possível, após colheita de urina para urinocultura. A antibioticoterapia é inicialmente instituída de forma empírica e, logo que possível, ajustada de acordo com o resultado do teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA). Na instituição de uma terapêutica empírica, há que ter em conta factores que se relacionam com o agente infectante, com o hospedeiro e com a farmacocinética dos antibióticos. É igualmente importante ter o conhecimento, em cada área comunitária, das bactérias mais frequentes, bem como do seu padrão de sensibilidade. Relativamente ao hospedeiro importa considerar a idade, os agentes infectantes mais frequentes de acordo com o grupo etário, a gravidade da situação clínica, a existência ou não de patologia nefro-urológica ou outra, bem como as terapêuticas antibióticas previamente instituídas. No que diz respeito aos fármacos, deve ser utilizado um antibiótico bactericida, com espectro de acção selectivo, com boa concentração urinária, com mínimo de efeitos secundários e com baixa capacidade de induzir o aparecimento de estirpes resistentes. Igualmente importante é a posologia, a tolerância e aceitabilidade dos preparados existentes no mercado, sobretudo quando a terapêutica é instituída em ambulatório. Os antibióticos com eliminação renal, mas que não atinjam concentrações terapêuticas na corrente sanguínea, tal como a nitrofurantoína, não devem ser utilizados para o tratamento da IU com febre, pois a sua concentração a nível do parênquima renal pode ser insuficiente para tratar uma pielonefrite ou uro-sépsis. A terapêutica oral ou parentérica tem a mesma eficácia. Com o objectivo de diminuir custos, favorecer o cumprimento terapêutico e diminuir o aparecimento de resistências aos antibióticos, recomenda-se que a duração do tratamento seja de 3-4 dias na ITU não febril e de 7 a 14 dias na ITU febril (79).

Seguidamente é descrito o esquema de tratamento nas infecções do tracto urinário em idade pediátrica, de acordo com as normas da DGS. (Tabela 10)

Tabela 10. Tratamento antibiótico das infecções do tracto urinário em idade pediátrica

	Via Oral	Via Endovenosa
1-3 meses	<u>Cefuroxime axetil</u> · 20-30 mg/kg/dia, 12-12h <u>Cefaclor</u> · 20-40 mg/kg/dia, 8-8h <u>Cefixima</u> · 8 mg/kg/dia, 12-12 horas	<u>Cefotaxima*</u> · 75-100 mg/kg/dia, 8-8h <u>Ceftriaxona*</u> · 50-75 mg/kg/dia, 24-24h * Se suspeita clínica e analítica de sepsis, associar Ampicilina, 100 mg/kg/dia, 6-6 h, via ev
> 3 meses	<u>Amoxicilina / ac clavulanico</u> · 20-40 mg/kg/dia de amoxicilina, 8-8h (125 mg, 250 mg ou 500mg/5 ml) · 25-45 mg/kg/dia de amoxicilina, 12-12h (400 mg/ 5 ml) Dose máxima diária de amoxicilina: 2 gr <u>Cefuroxime axetil</u> · 20-30 mg/kg/dia, 12-12h Dose máxima diária: 1 gr	<u>Amoxicilina / ac clavulanico</u> · 75-100 mg/kg/dia de amoxicilina, 8-8h Dose máxima diária de amoxicilina: 3 gr <u>Cefuroxime</u> · 75-150 mg/kg/dia, 12-12h Dose máxima diária: 1 gr
Adolescentes (sexo feminino)	<u>Nitrofurantoína</u> · 100 mg, 6-6h <u>Fosfomicina</u> · 3000 mg, dose única <u>Amoxicilina / ac clavulanico</u> <u>Cefuroxime axetil</u>	

Adaptado da referência: (79)

Uma revisão Cochrane, em que foram analisados 16 ensaios clínicos randomizados, foram incluídas 1116 crianças, num regime de 10 dias de antibioticoterapia, aumentou significativamente o número de crianças sem bacteriúria persistente, em relação à terapêutica com dose única (seis estudos, 228 crianças: risco

relativo=2,01, intervalo de confiança a 95%, 1,06 a 3,80). Bacteriúria persistente no final do tratamento foi relatado em 24% das crianças que receberam a terapia de dose única em comparação com 10% das crianças que foram escolhidos aleatoriamente para a terapia de 10 dias. Não houve diferenças significativas entre os grupos relativamente aos sintomas persistentes, recorrência ou re-infecção após o tratamento (92).

Deve ser considerada a necessidade de internamento em todas as crianças incapazes de tolerar comida por via oral ou quando o diagnóstico é incerto numa criança com aspecto marcadamente doente.

Deve fazer-se uma avaliação para se confirmar a resposta adequada 48 a 72 horas depois de iniciar a terapêutica antimicrobiana em todas as crianças com IU. Os resultados das culturas e testes de sensibilidade a antibióticos podem indicar a necessidade de mudar de terapêutica. Se for esperada uma melhoria clínica que não se observa, deve considerar-se um estudo mais vasto (por ex., estudos laboratoriais, de imagem e consulta a subespecialistas). A orientação para um subespecialista está indicada nas situações de refluxo vesicoureteral, cicatrizes renais, anomalias anatómicas ou se forem encontrados cálculos renais ou se houver necessidade de realizar procedimentos imagiológicos invasivos (93).

7.3. Profilaxia e seguimento

A taxa de recorrência no 1º ano após o diagnóstico de IU é cerca de 30% nos rapazes e de 40% nas raparigas, o que impõe a aplicação de medidas profiláticas, com o objectivo de diminuir a probabilidade de lesão renal (cicatriz) (93).

Num estudo observacional de crianças sem outros problemas de saúde e que tiveram a sua primeira infecção urinária, a profilaxia com antibióticos não se associou com diminuição do risco de IU recorrente, por outro lado, houve aumento de risco de aparecimento de microrganismos patogénicos resistentes (94, 95). Um estudo controlado aleatorizado de crianças dos dois meses até aos sete anos de idade mostrou que os antibióticos profiláticos durante 12 meses depois de uma IU febril não reduziu o risco de uma nova IU, mesmo nas crianças com refluxo vesicoureteral ligeiro a moderado (96). Outro estudo aleatorizado controlado em crianças e adolescentes concluiu que o uso profilático de antibióticos a longo prazo mostrou reduzir o risco de ITU sintomáticas de repetição em crianças vulneráveis, no entanto o benefício é pequeno, cerca de 6%, o que corresponde à necessidade de tratar a 14 crianças para evitar uma infecção urinária (97).

Isto deve ser considerado em conjunto com o aumento do risco de resistências microbianas, como os dados também sugeriram que a administração prolongada

resulta em alterações na susceptibilidade bacteriana com um aumento do risco de ITU sintomáticas provocadas por bactérias resistentes ao agente profilático (94, 97-99). De realçar também que, há evidências de que a escolha do antibiótico para a profilaxia é relevante. Cheng e seus colegas analisaram a resistência antimicrobiana de ITUs recorrentes em mais de 300 crianças que receberam quimioprofilaxia por causa do RVU e verificaram que as crianças que receberam a profilaxia com cefalosporinas são mais susceptíveis de ter ESBLs ou patogêneos multirresistentes, portanto, os autores sugerem que estes antibióticos não são adequados para utilização profilática em doentes com RVU (95, 98).

Para além disso, a profilaxia antibiótica contínua em crianças com menos de 2 anos e meio com refluxo vesicoureteral pode não reduzir o risco de pielonefrite ou de lesão renal (100). A meta-análise realizada por Mattoo incluiu 5 estudos, representando 809 doentes com 1 dia a 18 anos de idade com graus I a V de RVU e comparou a profilaxia antibiótica contínua com a utilização de placebo. Não houve benefício estatisticamente significativo pela utilização da profilaxia antibiótica contínua na prevenção de infecções do trato urinário ou cicatriz renal (101). No entanto, a profilaxia antibiótica pode ser mais benéfica em crianças com RVU mais grave (Grau III-V) (102).

Há alguma evidência de que o sumo de arando reduz as IUs sintomáticas durante 12 meses, especialmente nas mulheres com IUs recorrentes. A eficácia do sumo de arando em crianças é menos certa e a alta taxa de abandonos dos estudos indica que o sumo de arando pode não ser uma medida de profilaxia aceitável a longo prazo (57).

Outras estratégias terapêuticas como alternativas à profilaxia, para além de uma vigilância apertada na detecção de IU na criança febril sem outro foco, é o uso de probióticos (93).

Os fármacos mais utilizados são o trimetoprim, solução oral a 1% (manipulado) na dose de 1mg/Kg/dia ou a nitrofurantoína na dose de 1-2mg/Kg/dia, em toma única diária. As baixas doses destes fármacos têm a vantagem de, perante níveis séricos baixos e elevadas concentrações urinárias, impedir o aparecimento de resistências a bactérias entéricas e ao mesmo tempo o seu crescimento na urina.

Não existe consenso quanto à duração da profilaxia, mas nas crianças a quem foi instituída justifica-se mantê-la até:

- Conclusão da investigação imagiológica
- Cura da uropatia subjacente (excluindo o RVU)
- Resolução das condições que favorecem a estase urinária e disfunção vesical (93).

8. Resistências em bactérias de Gram-negativo

Os bacilos Gram-negativo constituem um grupo de microrganismos formado por numerosas espécies, as quais apresentam uma enorme diversidade de padrões de sensibilidade aos antibióticos. Além disso, estas bactérias dispõem não só de uma grande capacidade de adquirir genes de resistência, mas também de os transmitir, quer a elementos da mesma espécie, quer a outros de espécies diferentes. Isto acontece porque muitas destas resistências estão localizadas em unidades móveis de DNA, como são os plasmídeos, os transposões e os integrões. O aparecimento e a disseminação de microrganismos resistentes são um problema global que se tem agravado nas últimas duas décadas, sobretudo a nível hospitalar, pondo em causa a eficácia da maioria dos antibióticos utilizados na prática clínica. Tem sido demonstrado que a probabilidade de aparecimento da resistência é tanto maior quanto maior for a duração de exposição ao antibiótico. Por outro lado, os patógenos nosocomiais apresentam percentagens de resistência mais elevadas, e são mais prevalentes nos serviços hospitalares, particularmente nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), onde a pressão de selecção é grande, em virtude da grande utilização de antibióticos de largo espectro. Todos os grupos de antibióticos exercem uma maior ou menor pressão de selecção, no entanto, as quinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração são os antibióticos em que esta causa e efeito está melhor documentada. O uso excessivo das cefalosporinas de 3ª geração, para além de ocasionar o aparecimento de vários mecanismos de resistência por produção de β -lactamases, como é o exemplo das β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) e das Amp C plasmídicas, também, promove reinfecções por estirpes de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA) e por *Enterococcus spp* resistentes à vancomicina (VRE). O uso excessivo das quinolonas também se encontra associado a inúmeras resistências emergentes, algumas das quais com impacto directo na classe das fluoroquinolonas (resistência cruzada), uma vez que são capazes de seleccionar mutantes, principalmente nas bactérias Gram negativo, que produzem em quantidades excessivas, uma ampla variedade de bombas de efluxo, responsáveis por resistência a praticamente todos os grupos de antimicrobianos.

Também tem sido descrito por alguns autores, que o uso prévio de algumas fluorquinolonas estimula a produção de factores de adesão do *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes às células da mucosa nasal, facilitando quer a colonização, quer a persistência do estado de portador, e consequentemente a sua disseminação entre os doentes e no ambiente hospitalar.

O aparecimento e a disseminação destas estirpes multirresistentes, principalmente em meio hospitalar, tem suscitado graves problemas, quer do ponto de vista terapêutico, quer epidemiológico, motivando a implementação de programas de vigilância em diversos países.

Para além do aumento da pressão de selecção causada pelo uso dos antibióticos, principalmente os de espectro alargado, existem outros factores de grande relevância no aparecimento da resistência. Alguns desses factores estão relacionados com o hospedeiro, como: a idade avançada dos doentes, o aumento de patologias crónicas e agudas graves, que são causa, não só de internamentos mais prolongados, mas também de reinternamentos sucessivos, o número cada vez maior de doentes imunocomprometidos na população, que proporcionam o aparecimento de infecções por agentes oportunistas emergentes, e ainda aqueles que estão relacionados com os cuidados prestados aos doentes, ou seja a utilização frequente de métodos de diagnóstico / terapêutica mais invasivos, as deficiências no cumprimento das normas de controlo de infecção pelos profissionais de saúde, etc. Todas estas situações têm sido apontadas como factores de risco promotores do aparecimento de resistências aos antibióticos. Em relação aos primeiros pouco se pode fazer, em relação aos segundos está documentado que a implementação de critérios rigorosos da utilização dos antibióticos e o pleno cumprimento das normas de controlo da infecção acarretam uma diminuição da percentagem de resistência (95, 103-111).

9. Mecanismos de resistência aos antibióticos

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos do microrganismo ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação.

A resistência acontece através de dois grandes mecanismos: mutação num *loci* do cromossoma ou transferência horizontal de genes, isto é, por aquisição de genes de resistência anteriormente presentes noutros microrganismos (112).

Os genes responsáveis pela resistência contidos em plasmídeos, normalmente codificam enzimas que inactivam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células. Em contraste, a resistência conferida por mutações cromossomais envolve a modificação do alvo (113-115).

Quando se fala da evolução das bactérias é imprescindível referir as mutações que possam ocorrer, quer sejam induzidas quer sejam espontâneas. As mutações são alterações na estrutura dos genes, que podem ocorrer durante a replicação, e encontram-se sumariamente descritas na Tabela 11. As mutações induzidas devem-se à acção da radiação, como por exemplo a ultravioleta ou ionizante, os agentes alquilantes, a hidroxilamina ou a presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Se o erro for um benefício para a bactéria, como no caso da resistência aos antibióticos, então tenderá a predominar naquela espécie. Assim o maior problema da resistência mediada por mutação é a sua transmissão às gerações seguintes, o que torna a bactéria resistente predominante (116, 117).

A troca genética pode ocorrer por três mecanismos, transdução, transformação ou conjugação (Figura 2). Destes, o mais importante, devido à sua frequência e às consequências epidemiológicas é a conjugação. A transformação ocorre quando a molécula de DNA é transferida na lise de uma bactéria a qual é incorporada por outra bactéria. O gene de resistência a antibacterianos pode ser integrado no cromossoma ou plasmídeo da célula receptora. Transdução ocorre quando genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra por meio de bacteriófagos (também designados de fagos) e pode ser integrado ao cromossoma da célula receptora. Estes vírus podem incorporar fragmentos de ADN a partir de um organismo que tenham parasitado antes. Ao infectar uma nova bactéria, eles podem transferir (em adição aos seus próprios genes) ADN bacteriano. Este mecanismo tem sido associado com a propagação de algumas β -lactamases, especialmente em *Staphylococcus aureus* enquanto que a conjugação ocorre por contacto directo entre duas bactérias: os plasmídeos conjugativos são transferidos por uma ponte entre as bactérias e o DNA é trocado, o que pode resultar na aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos pela célula receptora. Estes eventos genéticos

ocorrem na presença ou ausência de antibacterianos (105, 118). Há, no entanto, várias formas em que a utilização de agentes antibacterianos contribui para o fenómeno da resistência (Figura 5)

Tabela 11. Descrição dos tipos de mutação que podem ocorrer

Tipo de mutação		Descrição	Consequências da mutação
Reposição	Transição	Troca de uma pirimidina por outra ou de uma purina por outra	Formação de codões <i>nonsense</i> que origina péptidos incompletos ou formação de codões <i>missense</i> que altera a proteína.
	Transversão	Troca de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa	
Delecção	Macrodelecção	Remoção de vários nucleótidos	Péptidos incompletos
	Microdelecção	Remoção de um ou dois nucleótidos	<i>Frame shift</i> resulta em codões <i>nonsense</i> ou em péptidos incompletos
Inserção	Macroinserção	Inclusão de vários nucleótidos	Péptidos incompletos
	Microinserção	Inclusão de um ou dois nucleótidos	<i>Frame shift</i> resulta em codões <i>nonsense</i> ou em péptidos incompletos
Inversão		Remoção de uma porção de ADN e inserção da mesma noutra local do cromossoma de forma invertida	Codificação de proteínas não funcionais

Adaptado da referência: (117).

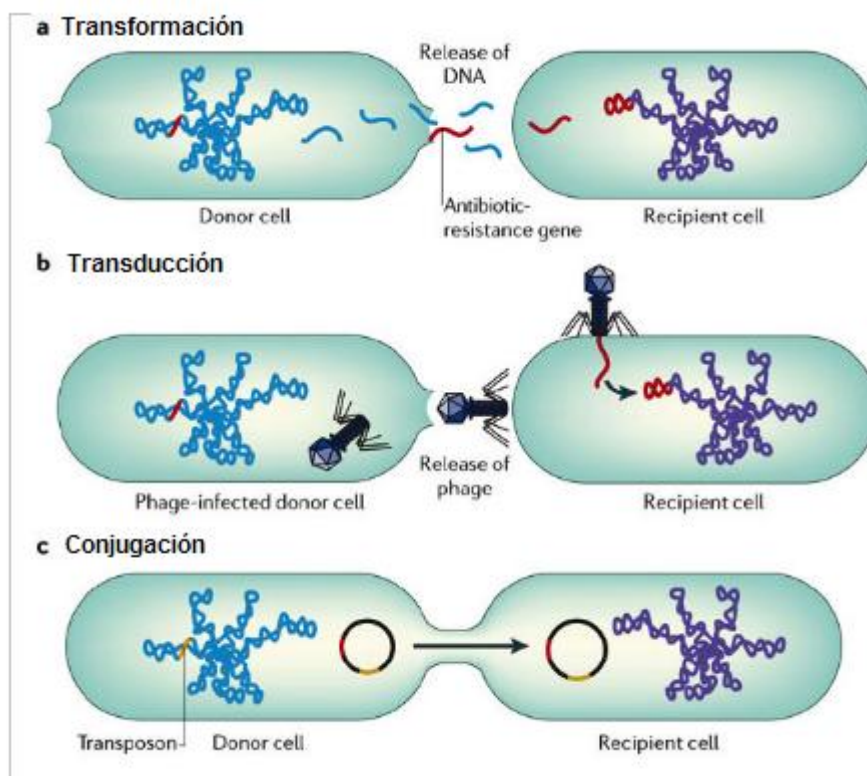


Figura 2. Transferência horizontal de genes entre bactérias. a) Transformação. b) Transdução. c) Conjugação

Adaptado da referência: (113).

9.1. Resistência Natural

A resistência natural é uma característica intrínseca de um microrganismo, que ocorre sem uma exposição prévia ao antibiótico. O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies ajuda a escolher as estratégias de tratamento empírico e dessa forma evita a utilização de terapêuticas ineficazes e inapropriadas (119). Na Tabela 12 pode-se encontrar alguns exemplos de resistência natural.

A resistência das bactérias a determinados antibióticos deve-se a quatro possíveis razões:

- Baixa afinidade do fármaco para o alvo bacteriano;
- Existência de enzimas que apresentem a capacidade de inactivar o antibiótico;
- Inacessibilidade do fármaco para a célula bacteriana;
- Eliminação do antibiótico pelos exportadores activos, codificados cromossomicamente;

Tabela 12. Resistência intrínseca de algumas bactérias na presença de certos antibióticos

Microorganismo	Antibiótico	Mecanismo de resistência intrínseco
Bactérias estritamente anaeróbias	Aminoglicosídeo	Incapacidade de atravessar a membrana interna, que se caracteriza por um processo dependente de oxigênio. A resistência ocorre, pois estas bactérias carecem do transporte adequado à entrada do antibiótico. As bactérias aeróbias facultativas só apresentam resistência quando crescem em condições de anaerobiose
Gram positivos	Aztreonam	Baixo número de PBPs onde se dá a ligação do antibiótico
Gram positivos (<i>Lactobacilli</i> spp.)	Vancomicina	Redução do alvo na parede celular impedindo a entrada do antibiótico
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampicilina	Deve-se à produção de β -lactamases, que inativam o antibiótico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sulfonamida, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol	Diminuição da entrada do antibiótico, levando a concentrações intracelulares muito baixas
	Macrólitos	A membrana externa destas bactérias apresenta uma baixa permeabilidade a substâncias hidrofóbicas (120)
<i>Mycoplasma</i> sp.	β -lactâmicos	Ausência de parede celular, onde actua o antibiótico (120)
Enterococos	Aminoglicosídeos	Diminuição do metabolismo oxidativo para que ocorra a entrada do antibiótico
	Todas cefalosporinas	Decréscimo de PBPs e a produção de β -lactamases.
Bacilos Gram negativos	MLS _B (Macrólitos, Lincosamida e Estreptogramina B)	Diminuição da permeabilidade na membrana externa aos compostos hidrofóbicos

Adaptado da referência: (119).

9.2. Resistência Adquirida

Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos que são: a alteração da permeabilidade, a alteração do local de acção, a bomba de efluxo e o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico. Estes mecanismos estão representados na Figura 3 e os antibióticos afectados pelos mesmos estão enumerados na Figura 4. (121-123)

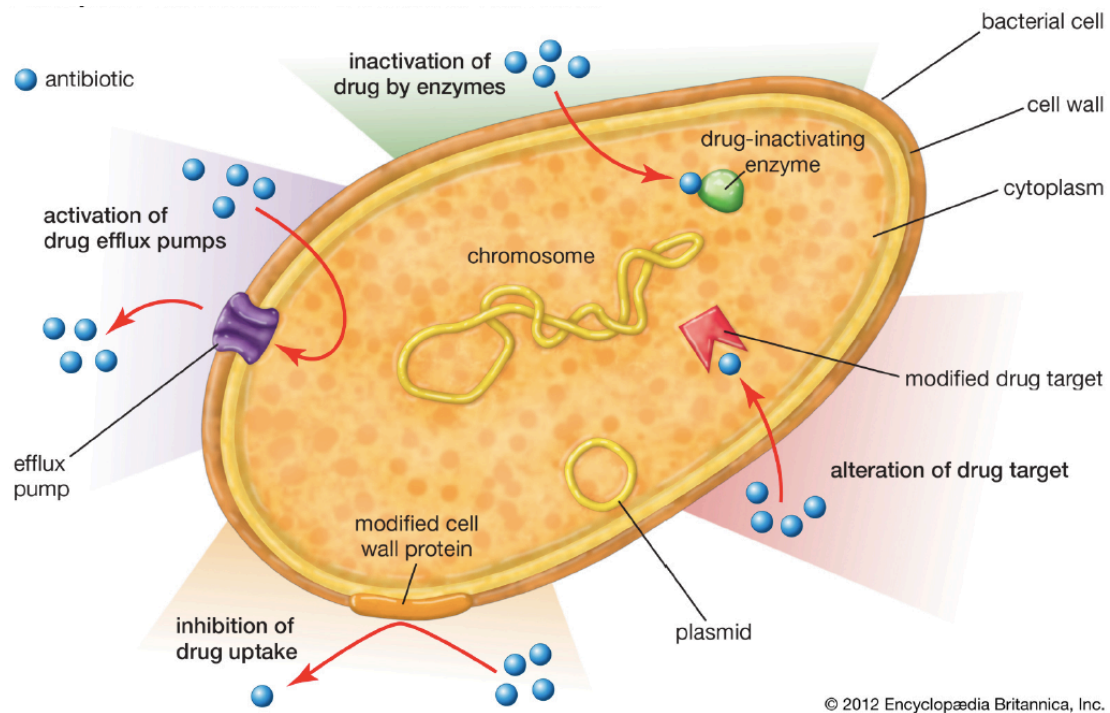


Figura 3. Mecanismos de resistência aos antibióticos.

Adaptado da referencia: (122)

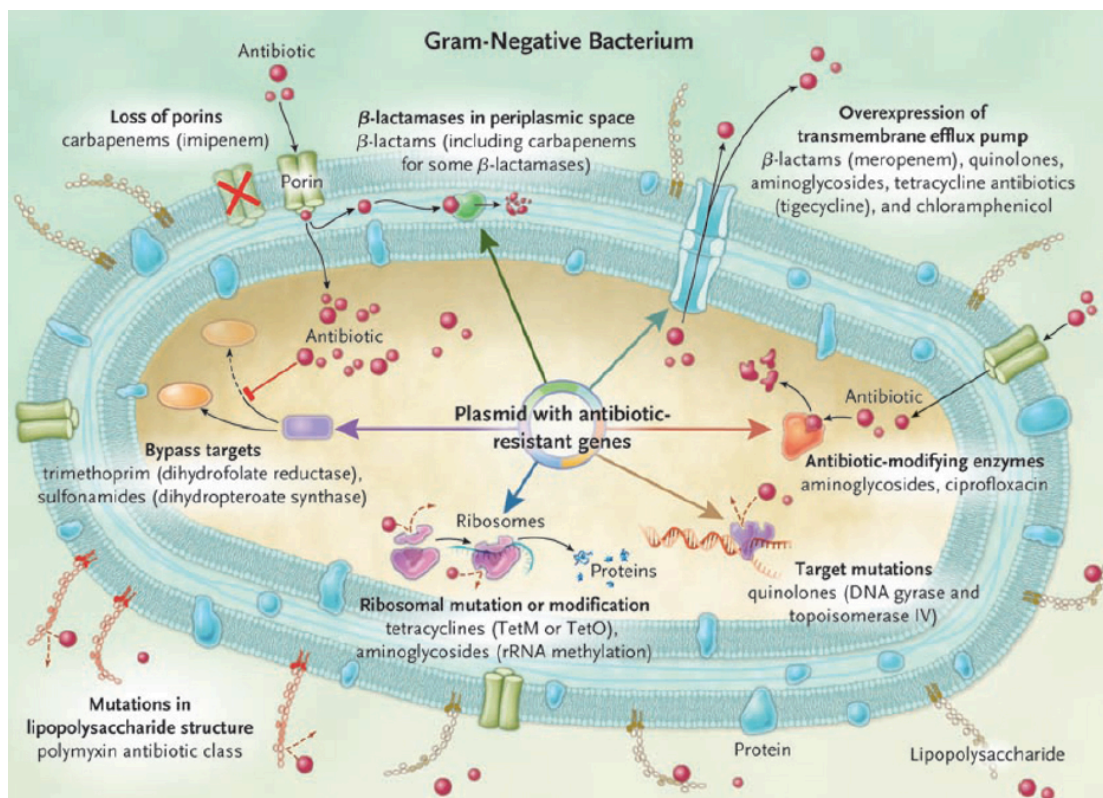


Figura 4. Antibióticos afetados pelos diversos mecanismos de resistência das bactérias Gram-Negativo.

Adaptado da referência: (121)

9.2.1. Inativação enzimática do fármaco

As bactérias podem produzir enzimas que alteram ou destroem a estrutura química de um antibiótico, tornando-o inativo. Este mecanismo de resistência pode ser melhor exemplificado pela família das enzimas β -lactamases, que actuam por hidrólise do anel β -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos. A resistência à penicilina em *S. aureus* e *Neisseria gonorrhoeae*, resistência à ampicilina em *Haemophilus influenzae*, e a resistência ao espectro alargado de cefalosporinas em *E. coli* e em *Enterobacter* são todas comumente mediadas pela produção de β -lactamases.

A resistência às cefalosporinas de espectro alargado (por ex., cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima) surgiu principalmente por mecanismos que envolvem a produção de β -lactamases. Em espécies de *E. coli* e *Klebsiella* têm frequentemente emergido mutações nos genes TEM, SHV e CTX-M. Na última década, o CTX-M tornou-se predominante em muitas partes do mundo. Em particular, CTX-M-15 é a mais disseminada, tendo sido esta β -lactamase frequentemente associada com um clone uropatogénico de *E. coli* conhecido pela sequência do tipo 131 (121). Outros

bacilos Gram-negativos resistentes são *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia*. Neste caso a resistência surge porque na maioria das vezes ocorre a selecção de mutantes que produzem cefalosporinases (AmpC) (105).

Além disso, estas bactérias são também muitas vezes resistentes a outras classes de antibióticos, como por exemplo, as fluoroquinolonas, trimetoprim, sulfametoxazol e aminoglicosídeos. As carbapenemases são capazes de degradar os carbapenemos e podem ser responsáveis pela resistência ao imipenemo e meropenemo em *Pseudomonas aeruginosa* e em outros bacilos de Gram-negativos. Um grupo importante e de rápida expansão de carbapenemases é a família KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) que são capazes de inactivar os β -lactâmicos, incluindo os carbapenemos. Os genes encontrados em KPC existem em plasmídeos que transportam frequentemente determinantes de resistência a outras classes de antibióticos. Embora estas enzimas sejam mais comumente encontradas em *K. pneumoniae*, elas também se disseminaram para outras *Enterobacteriaceae*. Surtos causados por estas estirpes multirresistentes já foram relatados nos Estados Unidos e em muitos países da Europa, Ásia e América do Sul (105).

9.2.2. Alteração do local de acção dos antibióticos

Este tipo de resistência caracteriza-se pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação. Esta ocorre por alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de ADN.

A alteração da estrutura do peptidoglicano consiste na inibição das enzimas que participam na construção do mesmo. Este mecanismo de resistência é observado em diversos antibióticos tais como, β -lactâmicos e glicopeptídeos (112).

Para os antibióticos poderem actuar, devem ligar-se a um local específico na bactéria, que depende da classe do antibiótico em causa. Uma mudança na estrutura do local de acção pode resultar na incapacidade do antibiótico exercer a sua actividade sobre a bactéria. Por exemplo, os β -lactâmicos actuam por ligação a proteínas de ligação à penicilina na membrana citoplasmática. Estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) contêm o gene *mecA* que codifica a produção de uma proteína de ligação a penicilinas (PBP 2a) que diminui a afinidade aos β -lactâmicos. Como resultado, as estirpes de MRSA são resistentes a todas as penicilinas actualmente disponíveis, às cefalosporinas e carbapenemos.

Um outro exemplo da resistência antimicrobiana provocada por uma alteração do local de acção, é a resistência às fluoroquinolonas (por ex., levofloxacina, ciprofloxacina e moxifloxacina). As fluoroquinolonas actuam através de proteínas,

inibindo a ADN girase (codificado pelos genes *gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (codificado pelo *ParC* e *ParE*), que são essenciais para a replicação do ADN bacteriano. Mutações em regiões específicas dos genes *gyrA* ou *parC* (conhecida como a região determinante de resistência às quinolonas) resultam em alterações de ADN girase ou topoisomerase e que fazem com que o antibiótico não se ligue às enzimas. Esta é a mutação mais comum encontrada na presença destes antibióticos. Nas bactérias Gram negativas a ADN girase é o principal alvo de todas as quinolonas. Nas bactérias Gram positivas tanto pode ser a ADN girase como a topoisomerase IV, dependendo da fluoroquinolona considerada (105, 118).

9.2.3. Alteração da permeabilidade e bomba de efluxo

Para um antibiótico se ligar ao seu alvo, tem de alcançar o local de acção e atingir uma concentração adequada. Desta forma, um outro mecanismo de resistência bacteriano consiste em impedir a chegada do fármaco até ao seu local de acção, que pode ocorrer por uma alteração da permeabilidade, ou pela presença de um mecanismo da bomba de efluxo (105).

Nas bactérias gram-negativas, os fármacos podem penetrar através da membrana externa de três formas, através de difusão pelas porinas, por difusão na bicamada fosfolipídica ou por *self promoted uptake*. A penetração na bactéria depende das características intrínsecas das moléculas de antibiótico. Desta forma os compostos hidrofílicos penetram através das porinas (ex., β -lactâmicos) ou por *self promoted uptake* (ex., aminoglicosídeos) (112, 124).

Neste tipo de resistência, a modificação da permeabilidade do antibiótico pode dever-se às alterações estruturais, do número, da selectividade ou do tamanho das porinas. Os antibióticos como os β -lactâmicos, fluoroquinolonas e tetraciclina penetram no interior da célula através de porinas presentes na membrana externa (124).

Qualquer diminuição na função ou quantidade de porinas levará à resistência da bactéria ao antibiótico, baixando o nível de antibiótico no espaço periplasmático e no local activo. Este é o mecanismo de resistência observado relativamente aos β -lactâmicos e aminoglicosídeos pela *P. aeruginosa* e em outras bactérias de gram-negativo (105).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas, representadas na Figura 5. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, isto é, o transporte activo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular (112).

Estas bombas de efluxo foram encontradas tanto em bactérias de gram-positivo como em gram-negativo. Este mecanismo afecta todas as classes de antibióticos, no entanto apresenta maior eficácia em macrólidos, tetraciclina e fluoroquinolonas, pois estes inibem a biossíntese de proteínas e de ADN (105, 112).

Existem diversos tipos de bombas de efluxo, que se categorizam em cinco classes de transportadores, tais como, *major facilitator family* (MFS), *multidrug and toxic efflux* (MATE), *resistance-nodulation-division family* (RND), *small multidrug resistance* (SMR), *adenosine triphosphate binding cassette* (ABC). A MFS, MATE, RND e SMR funcionam por troca de prótons, enquanto que a ABC actua por hidrólise de ATP (112, 123).

Algumas bombas de efluxo podem ser específicas para apenas uma classe de antibióticos, no entanto, há outras que podem estar associadas a resistência a múltiplos fármacos, uma vez que são capazes de exportar diferentes classes de antibióticos (105).

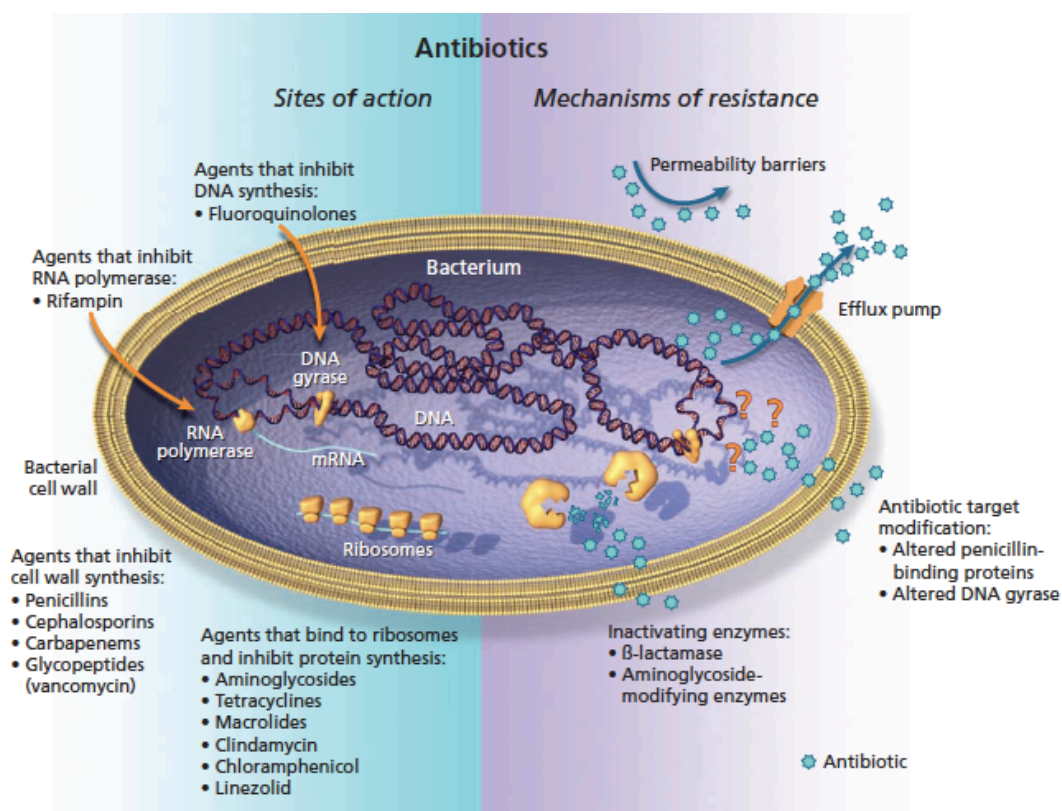


Figura 5. Locais de acção e mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias de Gram negativo.

Adaptado da referência: (105)

9.3. Disseminação clonal de estirpes resistentes a antibióticos

Estirpes resistentes aos antibióticos podem ser transmitidas entre pacientes nas unidades de cuidados de saúde, muitas vezes através das mãos contaminadas dos profissionais de saúde, equipamentos médico-cirúrgicos contaminados, ou com objectos inanimados do ambiente hospitalar.

Este tipo de disseminação é geralmente clonal, envolvendo a transmissão de uma única estirpe resistente. Surtos causados por disseminação clonal de um organismo resistente a antibióticos têm sido habitualmente notificados para MRSA, *enterococos* resistentes à vancomicina, *C. difficile* e bacilos de Gram-negativos multirresistentes. Focos de transmissão clonal em múltiplas unidades de saúde podem ocorrer também com a disseminação de uma estirpe comum, mesmo em diferentes regiões geográficas, como por exemplo, pela transferência de pacientes. No entanto, a clonalidade é menos provável de ocorrer com doenças esporádicas em áreas onde a prevalência é relativamente baixa, ou com certos microrganismos e mecanismos de resistência. Em alguns casos, um foco de resistência aos antibióticos pode ocorrer devido à transmissão de um plasmídeo, em vez da disseminação de uma única estirpe resistente (105).

10. Impacto da resistência bacteriana aos antibióticos na sociedade

A partir do século XX, a utilização dos antibióticos no combate às infecções bacterianas foi um grande passo na medicina moderna, no entanto, a resistência bacteriana não deu tréguas e rapidamente se propagou. Assim a resistência bacteriana não é um problema de cada indivíduo, mas sim um problema da sociedade.

É essencial consciencializar a sociedade para este problema (125).

As estratégias com maior impacto para a contenção das resistências aos antimicrobianos são as que se baseiam no uso racional e adequado de antibióticos, na prevenção e controlo da infecção e em programas de vigilância que avaliem a susceptibilidade dos microrganismos (126). A nível internacional têm sido criadas várias iniciativas com a intenção de limitar o aparecimento de resistências, nomeadamente os projectos European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) e o European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), que

em conjunto permitem avaliar as tendências actuais de utilização de antimicrobianos e estudar a emergência das resistências na Europa (127, 128).

De acordo com os últimos dados internacionais publicados em 2010 pelo ESAC, há grandes diferenças quanto aos padrões de utilização de antibióticos entre os países europeus (127). A classe das penicilinas continua a ser o grupo de antibióticos mais prescrito em todos os países da União Europeia (129). Em Portugal tem-se verificado

uma diminuição do consumo de antibióticos (127). Um estudo publicado na revista Lancet em 2001 referia que Portugal era o país da União Europeia com maior uso de quinolonas (130). Dados mais recentes, porém, revelam taxas de uso superiores em Itália, Chipre e Grécia (128).

Estudos realizados em 29 países da comunidade europeia, relativos à resistência bacteriana entre 2009 e 2012 (dois dos estudos indicados na Figura 6, Figura 7 e Figura 8) revelam um crescimento da mesma em bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (131).

A percentagem da resistência aos carbapenemos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* aumentou em 2012, diminuindo desta forma, as opções terapêuticas antimicrobianas para uma infecção provocada por este microrganismo.

Já a resistência nas bactérias Gram positivas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, está a estabilizar ou mesmo a diminuir em alguns países da Europa.

Em 2011, a resistência combinada às cefalosporinas de 3^a geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram as mais predominantes (131).

A maioria dos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, reportados em 2012 pelo EARS-Net, foram resistentes a pelo menos um dos agentes antimicrobianos sob vigilância, e muitos deles apresentaram resistência combinada às cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Isto é consistente com o aumento contínuo da tendência da resistência aos antimicrobianos observado em mais de um terço dos países estudados nos últimos anos, e uma alta percentagem de isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado. A tendência crescente pode ser observada não só nos países que têm percentagens relativamente baixas de resistências, mas também nos países com níveis já muito elevados.

Até ao fim dos anos 90, as ESBLs detectadas pertenciam aos tipos TEM e SHV (essencialmente ceftazidimases), mas durante os anos 2000, as enzimas CTX-M tornaram-se predominantes. Este tipo de enzimas, ao contrário das SHV e TEM, tem

uma maior actividade hidrolítica (cerca de 35 vezes superior) contra a cefotaxima do que contra a ceftazidima, sendo assim consideradas cefotaximases. No entanto, novas variantes com elevada actividade para ambos antibióticos já existem (como, por exemplo, CTX-M-15) (132, 133).

Em Portugal, a prevalência de *E. coli* produtora de β -lactamases tem vindo a aumentar, com predomínio de enzimas CTX-M-*type* a causar infecções do tracto urinário adquiridas na comunidade. Estudos em hospitais portugueses demonstram a disseminação de CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32, TEM-24, TEM-52, GES e SHV-12 (134).

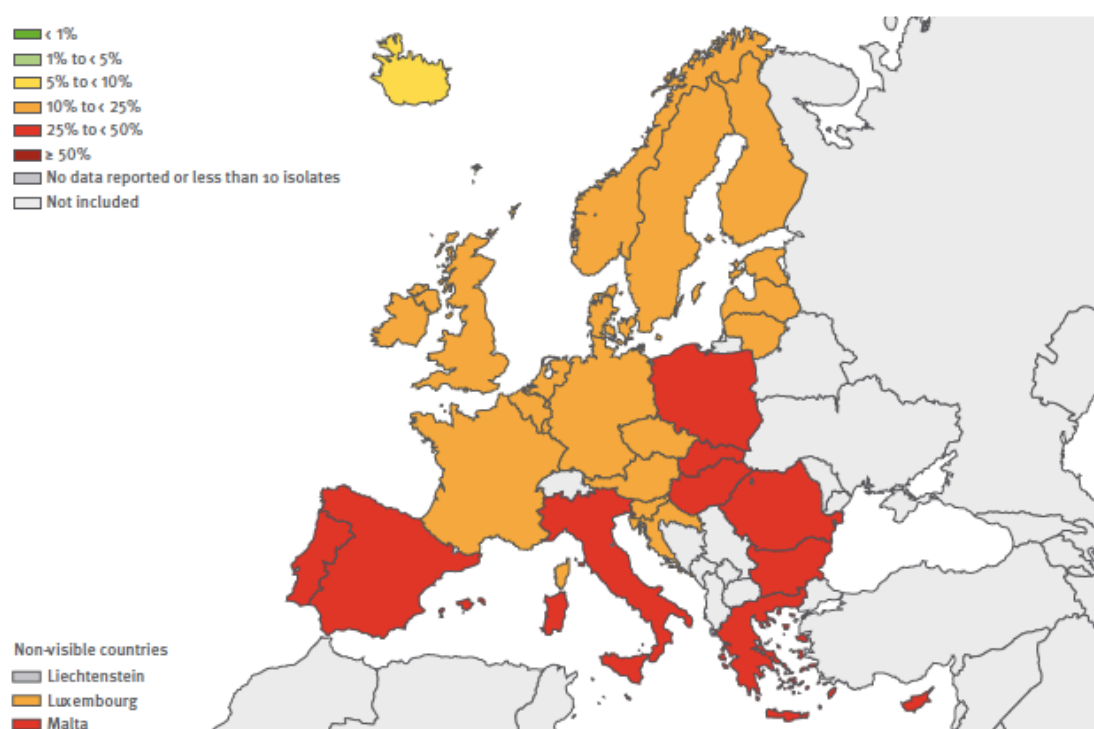


Figura 6. Resistência às fluoroquinolonas em *Escherichia coli*.

Adaptado de: <http://www.ecdc.europa.eu/>, acedido em 5 de Julho de 2014.

Portugal tinha em 2012, de acordo com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), uma das taxas de *E. coli* resistentes às quinolonas mais elevadas da Europa (30%) Figura 6.

O aumento da resistência às quinolonas está também associado a uma resistência a outras classes de antibióticos, nomeadamente β -lactâmicos e à associação trimetoprim/sulfametoxazol. A selecção de estirpes resistentes com elevada prevalência na comunidade pode estar relacionada com o uso frequente e

indiscriminado destes antibióticos usualmente utilizados na terapêutica quer de infecções urinárias quer respiratórias.

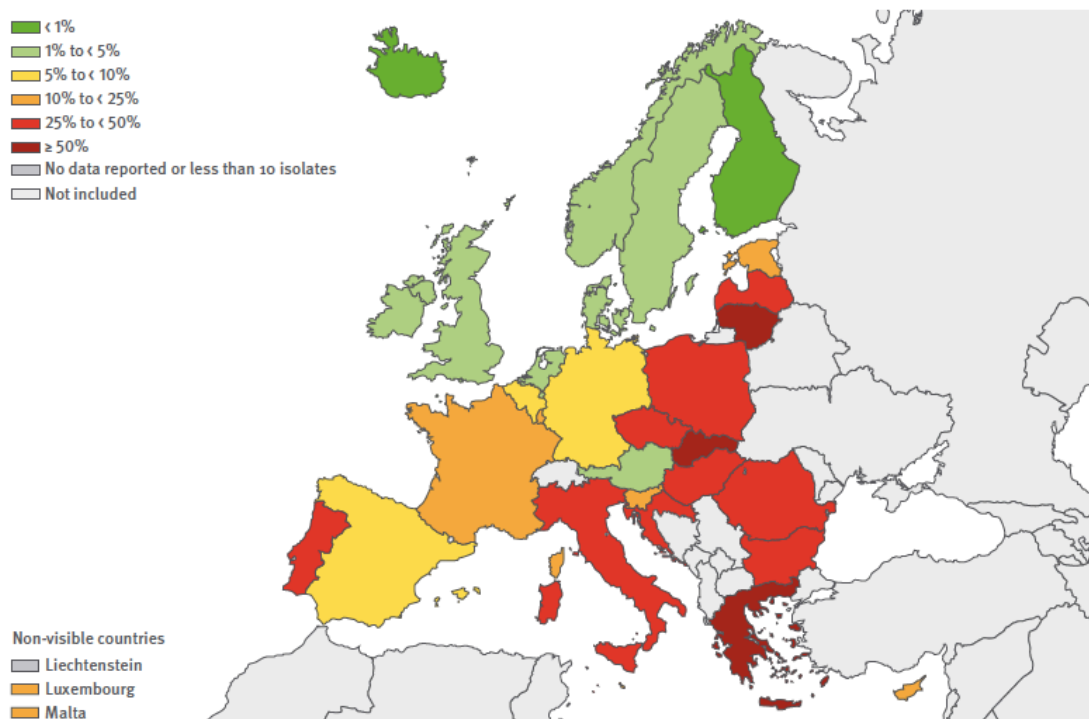


Figura 7. Resistência combinada às cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, em *Klebsiella pneumoniae*.

Adaptado de: <http://www.ecdc.europa.eu/>, acedido em 5 de Julho de 2014.

Também nos dados da resistência combinada, às cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, em *Klebsiella pneumoniae*, Portugal está entre os países da Europa com uma taxa de resistência elevada, compreendida entre 25-50% Figura 7.

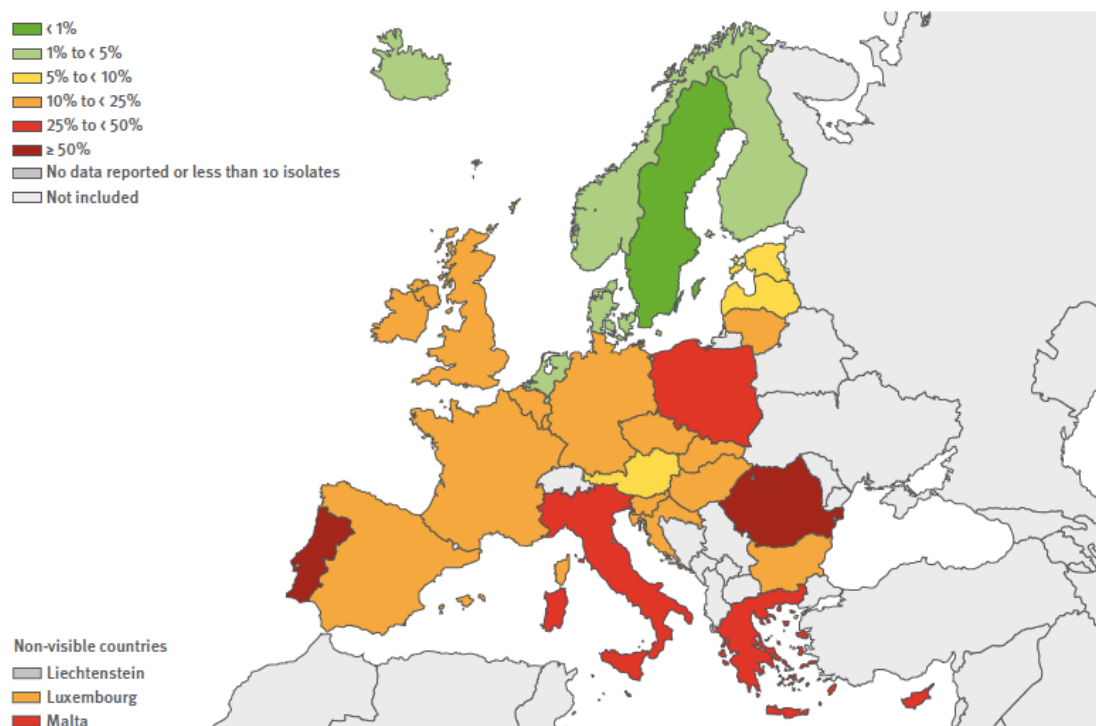


Figura 8. Resistência à metilina em *Staphylococcus aureus*.

Adaptado de: <http://www.ecdc.europa.eu/>, acedido em 5 de Julho de 2014.

As resistências bacterianas levam à existência de poucas opções terapêuticas, em infecções que podem ser fatais. Segundo o INSA, em Portugal as resistências mais importantes são: *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), enterococos resistentes à vancomicina, bactérias Gram negativas produtoras de β -lactamase de espectro alargado e meningococos com susceptibilidade diminuída à penicilina (125).

Em termos percentuais e tal como se pode verificar na Figura 8 e na Tabela 13, um dos maiores problemas é a resistência à metilina em *Staphylococcus aureus* que tem vindo a aumentar ao longo dos anos, e embora nos últimos quatro anos se tenham mantido estável, a sua percentagem continua elevada. No que respeita à resistência à Vancomicina em *Enterococcus faecium* tem-se mantido estável (128)

Tabela 13. Percentagem de resistência aos antibióticos em diversas bactérias, em Portugal, desde 2003 a 2012

Microrganismo por classe de antibiótico	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>Streptococcus pneumoniae</i>										
Penicilina	<1	<1	<1	<1	<1	<1	18	15	8	5
Macrólidos	-	20	19	21	23	22	22	22	15	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>										
Aminoglicosídeos	-	-	<1	13	11	19	20	27	32	32
Fluoroquinolonas	-	-	<1	20	18	22	28	31	36	36
Cefalosporinas 3ªG.	-	-	-	21	17	26	28	28	35	39
Carbapenemos	-	-	-	-	<1	<1	<1	1	<1	<1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
Piperacilina	-	-	-	15	14	17	17	18	19	20
Ceftazidima	-	-	-	19	16	16	13	12	15	15
Carbapenemos	-	-	-	21	15	18	16	16	20	20
Aminoglicosídeos	-	-	-	17	16	11	12	14	15	15
Fuoroquinolonas	-	-	-	21	19	23	21	20	26	26
<i>Enterococcus faecalis</i>										
Aminopenicilinas	4	5	<1	2	4	4	7	17	24	12
Gentamicina	34	29	38	41	41	43	34	39	30	43
Vancomicina	3	6	5	5	4	4	4	2	4	3
<i>Enterococcus faecium</i>										
Aminopenicilinas	88	83	92	76	93	86	91	91	81	94
Gentamicina	55	66	68	53	49	28	49	53	38	58
Vancomicina	47	42	34	26	29	24	23	23	20	23
<i>Escherichia coli</i>										
Aminopenicilinas	53	58	58	59	59	58	58	56	57	59
Aminoglicosídeos	9	13	12	12	12	14	11	12	16	16
Fluoroquinolonas	26	27	29	28	30	29	28	27	27	30
Cefalosporinas 3ªG.	7	8	12	10	10	10	9	10	11	14
Carbapenemos	-	-	-	-	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<i>Staphylococcus aureus</i>										
Oxacilina/Meticilina	45	46	47	48	48	53	49	53	55	54

Adaptado da referência: (128)

11. Infecções associadas a Cuidados de Saúde

Calcula-se que as infecções (nosocomiais) adquiridas no hospital (definidas como as que não estão presentes nem em incubação no momento do internamento) e outras infecções associadas a cuidados de saúde afetem > 2 milhões de doentes, custem 4,5 mil milhões de dólares e contribuam para 88.000 mortes nos hospitais nos EUA em cada ano. Os esforços para baixar os riscos de infecção têm sido desafiados pelo número cada vez maior de doentes imunocomprometidos, pelas bactérias resistentes aos antibióticos, às superinfecções por fungos e vírus e aos procedimentos e dispositivos invasivos.

11.1. Prevenção de infecções adquiridas no Hospital

Os programas hospitalares de controlo de infecções recorrem a diversos mecanismos para prevenir as infecções nosocomiais (135).

- Vigilância: análise dos resultados dos laboratórios de microbiologia, levantamento dos resultados das enfermarias e a utilização de outros mecanismos para seguir o desenvolvimento de infecções adquiridas após o internamento. Os programas hospitalares de controlo de infecções focam-se em primeiro lugar nas infecções associadas a maior morbilidade e a custos mais elevados.
- Medidas de prevenção e combate: a higiene das mãos é a medida isolada mais importante para evitar a infecção cruzada. Outras medidas incluem a identificação e erradicação de reservatórios de infecção e minimização do uso de procedimentos invasivos e cateteres.
- Técnicas de isolamento para limitar a propagação de infecção.
 - As precauções padrão são usadas para todos os doentes quando há a possibilidade de contacto com sangue, líquidos corporais, pele não intacta e mucosas. A higiene das mãos e o uso de luvas são elementos centrais das precauções padrão; em certos casos também se usam máscaras, protecção dos olhos e batas.
 - Diretrizes relacionadas com a transmissão: Precauções com a transmissão aérea, precauções com gotículas e precauções com contacto são tomadas para evitar a transmissão de doença a partir de doentes infectados. Visto que na pele intacta de doentes infectados podem existir bactérias resistentes a antibióticos, qualquer contacto com doentes que possam alojar tais bactérias devem implicar higiene das mãos e o uso de luvas. Também se usam frequentemente batas,

se bem que seja menos clara a sua importância para evitar a infecção cruzada.

11.2. Infecções Nosocomiais e Relacionadas com Dispositivos

As infecções nosocomiais devem-se ao efeito combinado da flora do próprio doente e à presença de dispositivos invasivos em 25-50% dos casos. Educação intensiva e intervenções baseadas na evidência, reduzem as taxas de infecção (Tabela 14) (135).

Tabela 14. Exemplos de intervenções para prevenir infecções das vias urinárias associadas a cuidados de saúde

Colocar cateteres da bexiga somente quando absolutamente necessário (por ex., para aliviar a obstrução), não apenas para a conveniência do prestador de cuidados.
Utilizar técnica asséptica para a inserção do cateter e instrumentação das vias urinárias.
Minimizar a manipulação ou a abertura dos sistemas de drenagem.
Remover cateteres da bexiga com a maior brevidade possível.

Adaptado da referência: (135)

Cerca de 40-45% das infecções nosocomiais são ITU. A maioria destas infecções está associada com instrumentação prévia ou cateterismo permanente da bexiga. O risco de infecção de 3 a 10% por cada dia que um cateter permanece inserido deve-se à ascensão das bactérias da área periuretral ou via contaminação intraluminal do cateter. O doente deve ser avaliado a sintomas de doença das vias superiores, tais como dor no flanco, febre e leucocitose. Os sintomas das vias urinárias inferiores, como disúria, não são fiáveis como marcadores de infecção de doentes cateterizados. Se houver suspeita de infecção, o cateter deve ser substituído, obtendo-se uma amostra de urina recém-eliminada para urocultura. Culturas repetidas devem confirmar a persistência da infecção na altura do começo da terapia. O sedimento urinário deve ser examinado para confirmação da infecção (p.ex., piúria) (135).

11.3. Prevenção da ITU associada à algaliação de curta e média duração

A infecção urinária corresponde a cerca de 40% do total de infecções nosocomiais, associando-se em aproximadamente 80% dos casos, à presença de algália, o que justificou uma nova definição a ter presente, que é a infecção urinária associada a algaliação (136-140).

O uso de algália constitui hoje uma componente essencial dos cuidados de saúde. A frequência com que os doentes são algaliados e o tempo da permanência da algália determinam o risco de infecção. A bacteriúria surge em 3-10 % dos doentes por dia de algaliação, sendo a duração da algaliação um dos principais factores de risco para o desenvolvimento de infecção urinária.

As práticas de algaliação, manutenção e remoção também são relevantes do ponto de vista da prevenção e controlo da ITU. A bacteriúria sem sinais clínicos pode representar um reservatório de microrganismos resistentes. A ITU constitui também uma causa importante de bacteriúria nosocomial podendo contribuir para um aumento da mortalidade (138).

Não há unanimidade no conceito de infecção urinária associada a algaliação, e o principal ponto de discórdia está naqueles doentes que apresentam uma urocultura positiva com entre 10^3 e 10^5 CFU/mL. Segundo o IDSA (Infectious Diseases Society of America) se há sinais/sintomas compatíveis com infecção urinária deve definir-se esta situação como infecção urinária, no entanto, o CDC (Center of Disease Control) considera que nesta situação além de haver sintomas/sinais compatíveis com infecção urinária deve haver uma análise de urina sugestiva de infecção, nomeadamente fita reagente urinária positiva para esterase leucocitária ou nitritos, piúria ou presença de microorganismos na coloração gram (137, 141).

Dada a alta frequência da infecção urinária associada a algaliação transitória nos hospitais, e também nos domicílios e residências de idosos, nestes casos, com algaliação permanente, foram definidas e sucessivamente revistas normas de orientação clínica dedicadas em exclusivo a este tipo de infecções, não só abordando o seu diagnóstico e tratamento, também a sua prevenção (137, 141-144). O IDSA, o CDC e a Sociedade Europeia de Urologia, são coincidentes nas principais recomendações para a prevenção da infecção urinária associada a algaliação, e podem-se concretizar em:

- Evitar o uso inapropriado ou prolongado da algália. É neste sentido que surge a ideia dos “reminders”, lembretes de algaliação, destinados ao enfermeiro e médico do doente para lembrar a presença de algália. Outra modalidade são as

denominadas “stop orders” ou ordens automáticas de desalgaliação, activadas quando o doente satisfaz uma lista de critérios para a desalgaliação, que o enfermeiro vai verificar diariamente sem necessidade neste caso de uma intervenção médica (145-149).

- Quando for necessária a algaliação, devem existir procedimentos correctos de escolha do material, inserção, manutenção e retirada da algália.
- Procurar alternativas a algaliação do doente sempre que possível
- Formação dos profissionais
- Fornecimento de normas de orientação clínica, periodicamente actualizadas, aos profissionais

12. Estudo de caso

No seguimento desta monografia foi elaborado um estudo no laboratório de análises clínicas R&S S.A. durante o período de estágio do mestrado em Análises Clínicas.

12.1. Objectivo

O objectivo fundamental deste trabalho consiste em:

- Identificar e conhecer o comportamento das estirpes mais prevalentes que provocam infecções do tracto urinário isoladas de urinas e avaliar o padrão de resistências a antimicrobianos em *Escherichia coli*, a antibióticos frequentemente utilizados no regime de ambulatório no período de 2010 a 2014, na região Dão-Lafões (NUTS III), englobando entre outros os concelhos de Viseu, Sátão, Vila Nova de Paiva, Sernancelhe, Penedono e Aguiar da Beira, e comparar os resultados das análises bacteriológicas com outros estudos nomeadamente, EARS – ECDC.

12.2. Materiais e Métodos

O estudo, foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Rodrigues & Saraiva SA, no Sátão, recorrendo-se a um total de 18.963 uroculturas no período de 1 de Janeiro de 2010 a 30 de Junho de 2014. A recolha de dados foi feita utilizando como suporte informático o software Sislabs® e o tratamento estatístico dos resultados foi processado no programa informático *Microsoft Office Excel 2010*.

Todas as urinas foram semeadas em meio cromogénico (CPS ID 3 BioMérieux®) e incubadas durante 24h a 37°C. A identificação bacteriana e o estudo de sensibilidade aos antibióticos em isolados de *Escherichia coli* foram realizados utilizando o sistema VITEK 2 (BioMérieux®).

Os antibióticos escolhidos para estudo foram seleccionados de acordo com critérios específicos:

- Utilização ao longo de todos os anos do estudo
- Frequente utilização em ambulatório
- Resistências já reportadas em literatura científica

Antibióticos escolhidos: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; Cefalosporinas (Cefuroxima); Ciprofloxacina; Fosfomicina; Nitrofurantoína e Trimetropim/Sulfametoxazol.

12.3. Resultados e Discussão

12.3.1. Amostras

Verificou-se no estudo um aumento progressivo de uroculturas positivas nos últimos anos, tanto no sexo masculino como no feminino Tabela 15.

- Até 2012/2013 nota-se um pedido cada vez mais direccionado para situações em que existem dados clínicos que sustentem a realização da urocultura.
- Ano 2014 observa-se um decréscimo de uroculturas positivas devido à realização do teste de despiste rápido na consulta médica, com antibioterapia e apenas posterior confirmação do sucesso da terapêutica.

Tabela 15. Resultados obtidos das uroculturas no período de Janeiro de 2010 a Junho de 2014

ANO	HOMEM			MULHER		
	POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
2010	118	1119	1237	484	2827	3311
2011	131	1178	1309	513	2798	3311
2012	81	937	1018	497	2271	2768
2013	98	950	1048	565	2366	2931
2014*	44	490	534	261	1235	1496

* - Dados até ao dia 30 de Junho de 2014

Entre 2792 isolados bacterianos estudados, *Escherichia coli* foi o agente predominante (71,5%, n=1658), seguido de *Klebsiella* spp. (10,7%, n=249), *Enterococcus* spp. (7,6%, n=176) e *Proteus mirabilis* (4,1%, n=95).

No sexo feminino, *Escherichia coli* foi o agente predominante (77,7%, n=1477), seguido de *Klebsiella* spp. (9,9%, n=189), *Enterococcus* spp. (4,8%, n=92) e *Proteus mirabilis* (2,8%, n=54). No sexo masculino, *Escherichia coli* foi o agente predominante (42,9%, n=178), seguido de *Enterococcus* spp. (20,2%, n=84), *Klebsiella* spp. (14,5%, n=60), *Proteus mirabilis* (9,9%, n=41) e *Pseudomonas* spp. (8,7%, n=36) Figura 9. As tendências mundiais apontam para prevalências de *E. coli* em infecções urinárias que variam entre 75 e 95% (150), estando este estudo de acordo com esses dados.

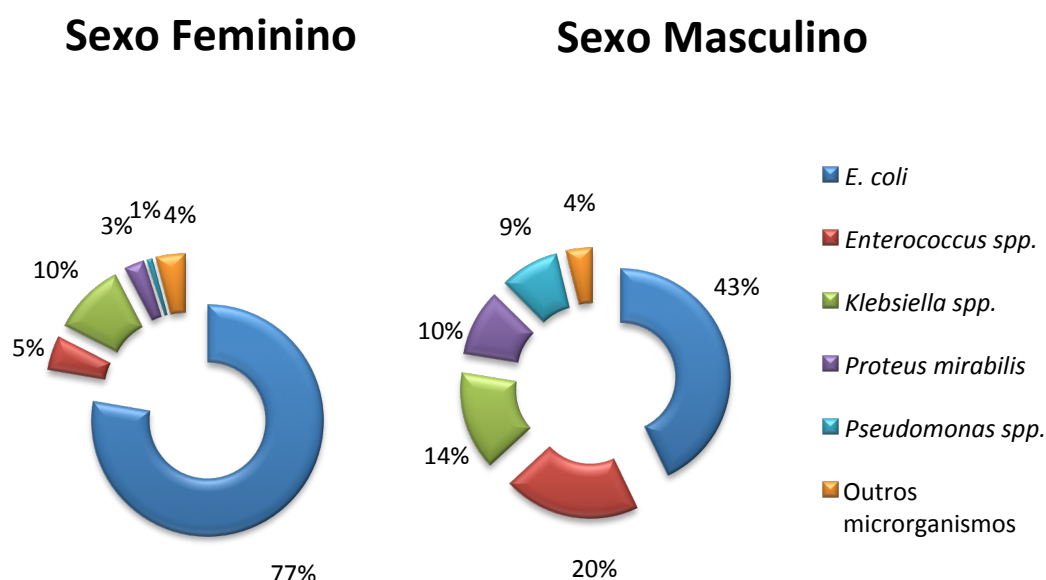


Figura 9. Microrganismos isolados em uroculturas positivas entre 2010 e 2014

12.3.2. Estudo da susceptibilidade aos antibióticos em isolados de *Escherichia coli*

O resultado do estudo da susceptibilidade aos antibióticos nas 1658 *Escherichia coli* está representado no Gráfico 1.

Neste grupo, verificou-se um maior número de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina (16,5%, n=272) e à combinação trimetoprim/sulfametoxazol (23,0%, n=378) e um menor número de resistentes à fosfomicina (2,6%, n=41), à nitrofurantoína (2,2%,

n=36), à cefuroxima (6,8%, n=101) e à combinação amoxicilina/ácido clavulânico (6,5%, n=95).

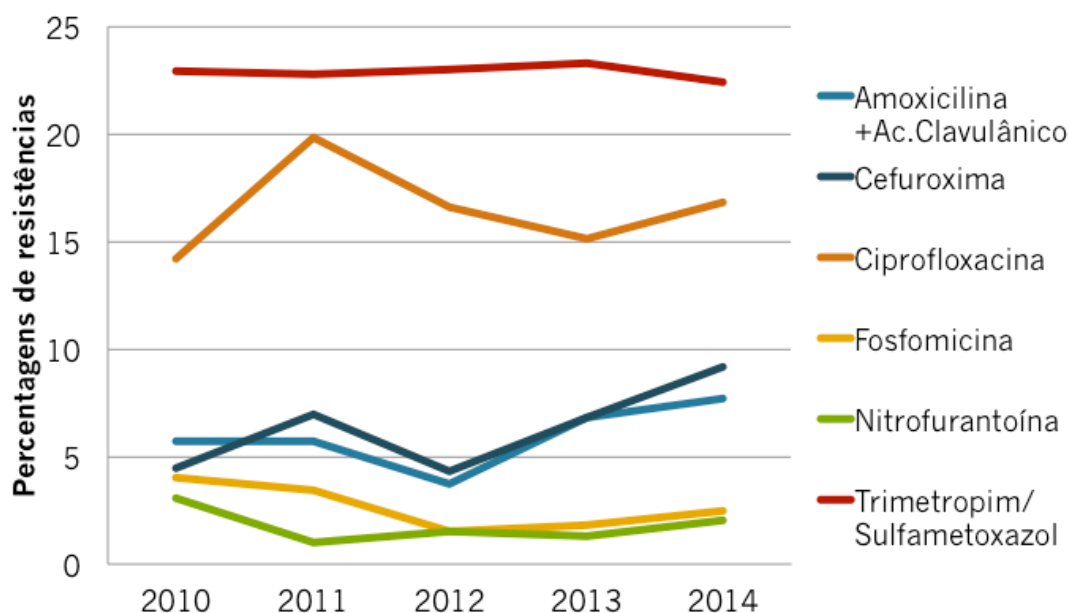


Gráfico 1. Perfil de susceptibilidade de *E. coli* aos antibióticos. AMC- Amoxicilina/Ácido Clavulânico; CIP- Ciprofloxacina; CXM- Cefuroxima; FOS- Fosfomicina; FT- Nitrofurantoína; SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazol

A resistência aos antibióticos de primeira linha no tratamento de infeções do tracto urinário tem aumentado nos últimos anos, limitando as escolhas terapêuticas. O aumento da resistência às fluoroquinolonas está associado a uma resistência a outras classes de antibióticos, nomeadamente β -lactâmicos e a associação trimetoprim/sulfametoxazol. Segundo o *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (128) a Europa possui taxas de *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas entre 9,7% na Islândia e 42% no Chipre e Itália (Portugal com 30%). No entanto, o estudo ECO-SENS (126), que se refere apenas a *E. coli* responsável por infeções urinárias não complicadas, reporta taxas de resistência que variam entre 0 e 14,7% (Portugal com 5,8%). Tendo em conta que *E. coli* é o principal agente responsável por infeções do tracto urinário, quer na comunidade, quer no hospital, e que neste trabalho, a resistência à ciprofloxacina é superior a 16%, é reforçada a necessidade de reavaliação do uso de fluoroquinolonas no tratamento da ITU, Gráfico 2.

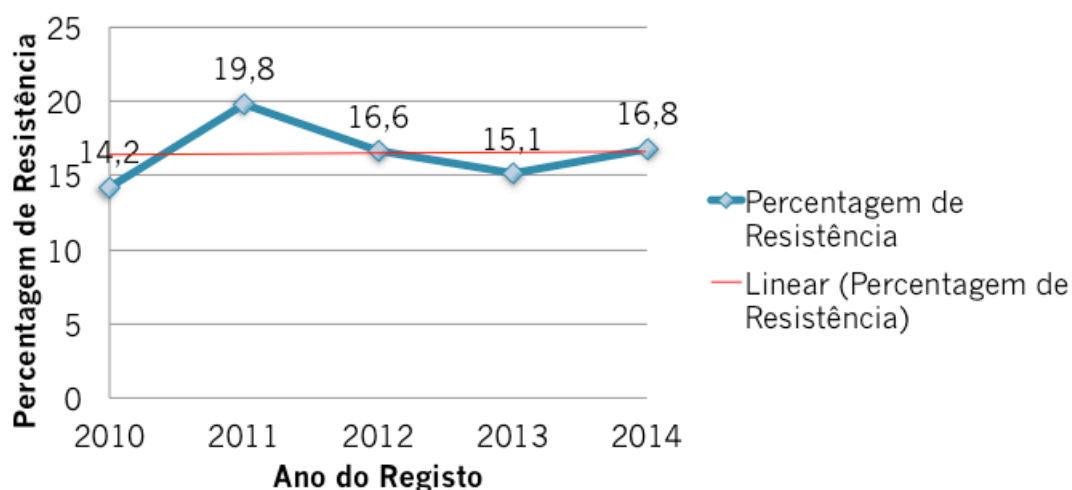


Gráfico 2. Padrão de resistência de *E. coli* à ciprofloxacina

A frequência de 23% de isolados resistentes neste estudo põe em causa a utilização do trimetopim/sulfametoxazol, o que está de acordo com a norma portuguesa nº 015/2011 da DGS pelo que não é considerado no tratamento empírico de infeções urinárias na comunidade portuguesa. De notar que os dados de resistência relativos ao ano de 2014 são limitados até à data de 30 de Junho, Gráfico 3.

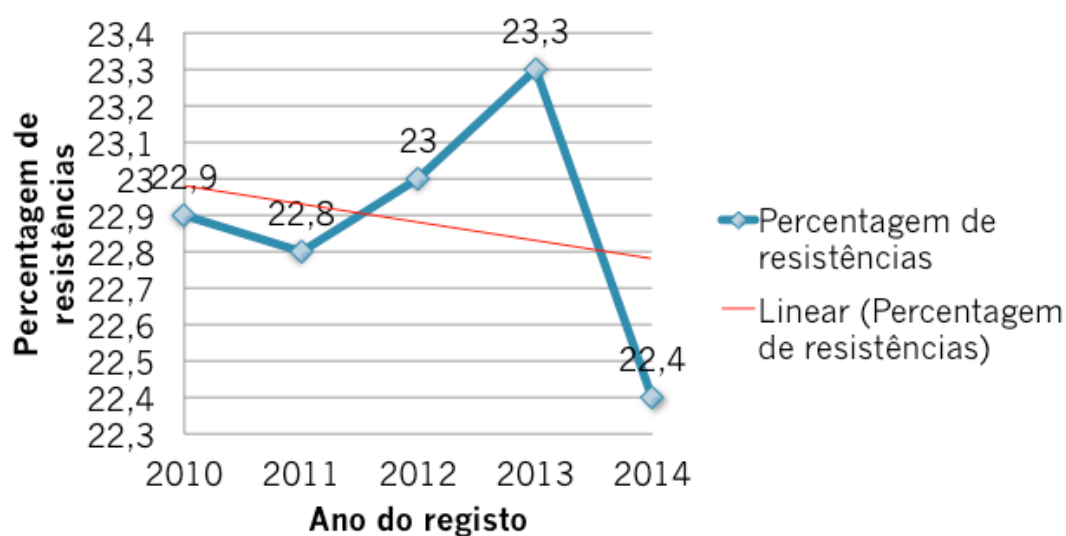


Gráfico 3. Padrão de resistência de *E. coli* à associação Trimetopim/Sulfametoxazol

Uma das alternativas propostas por estas associações, perante o panorama do aumento das resistências ao trimetoprim/sulfametoxazol e à ciprofloxacina (antibióticos previamente considerados de primeira linha no tratamento destas infeções), é a nitrofurantoína. Obteve-se uma taxa de isolados resistentes a este antibiótico de 11,4%, incluindo porém todos os géneros microbianos encontrados,

nomeadamente *Proteus* spp. que é naturalmente resistente a este antibiótico. Se contabilizarmos a resistência apenas nos isolados de *E. coli*, este valor desce para os 1,8% (36 em 1641), Gráfico 4. No entanto, este antibiótico está associado a menor taxa de cura e mais efeitos secundários que os referidos anteriormente (151).

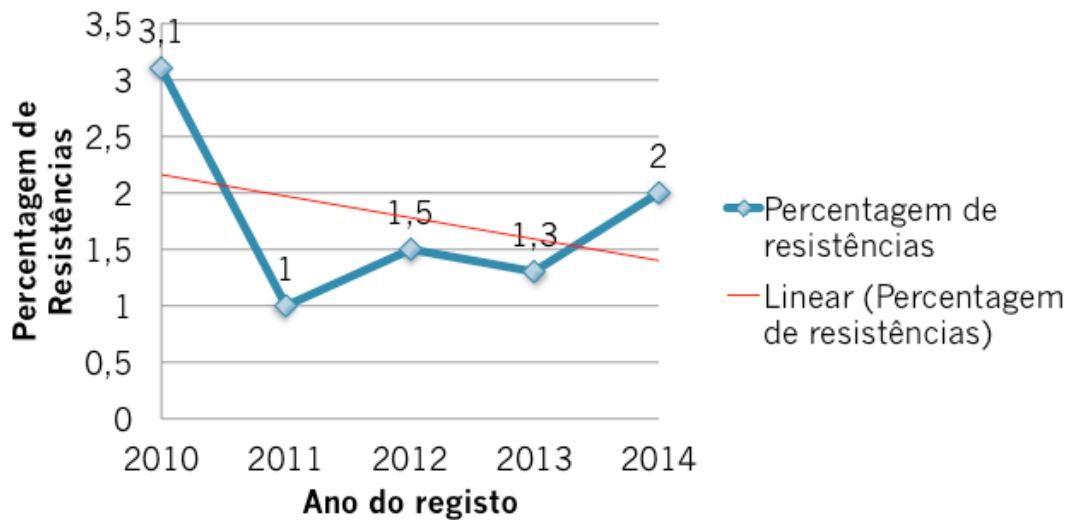


Gráfico 4. Padrão de resistência de *E. coli* à nitrofurantoína

Quanto aos β -lactâmicos, incluindo a amoxicilina/ácido clavulânico e as cefalosporinas (cefuroxima), a sua prescrição deve ser cautelosa pois a resistência a estes antimicrobianos tem vindo a aumentar nos últimos anos, e neste estudo, 6,5% (n=95) e 6,8% (n=101), respectivamente, dos isolados apresentam resistência, o que pode indicar uma probabilidade de aumentar o número de bactérias resistentes, Gráfico 5 e Gráfico 6.

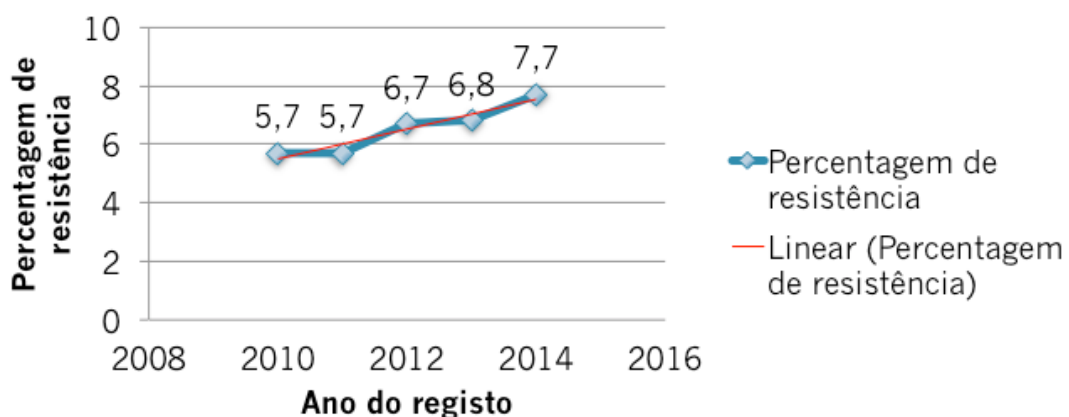


Gráfico 5. Padrão de resistência de *E. coli* à associação Amoxicilina+Ácido Clavulânico

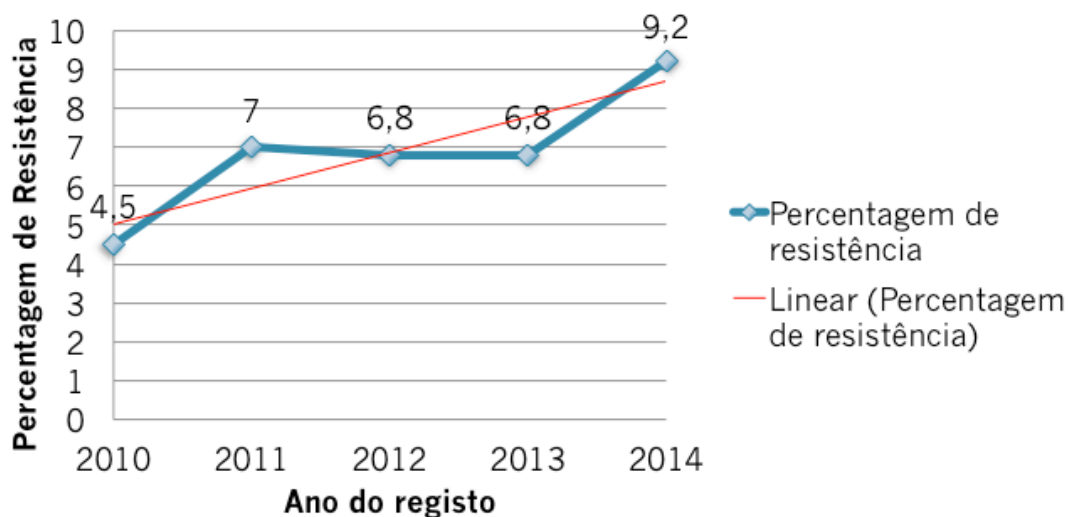


Gráfico 6. Padrão de resistência de *E. coli* à cefuroxima

Neste estudo a resistência à fosfomicina foi de 2,6%, o que é concordante com vários estudos europeus, que apontam para resistências entre 0 e 2,5%, Gráfico 7 (152, 153).

A fosfomicina poderá ser então o antibiótico de primeira escolha para o tratamento empírico das cistites não complicadas em mulheres jovens, visto que nestas a etiologia é maioritariamente devida à *E. coli* (70 - 80%), assim como pela alta sensibilidade que mantém na região de Viseu (97%), embora mais estudos sejam necessários.

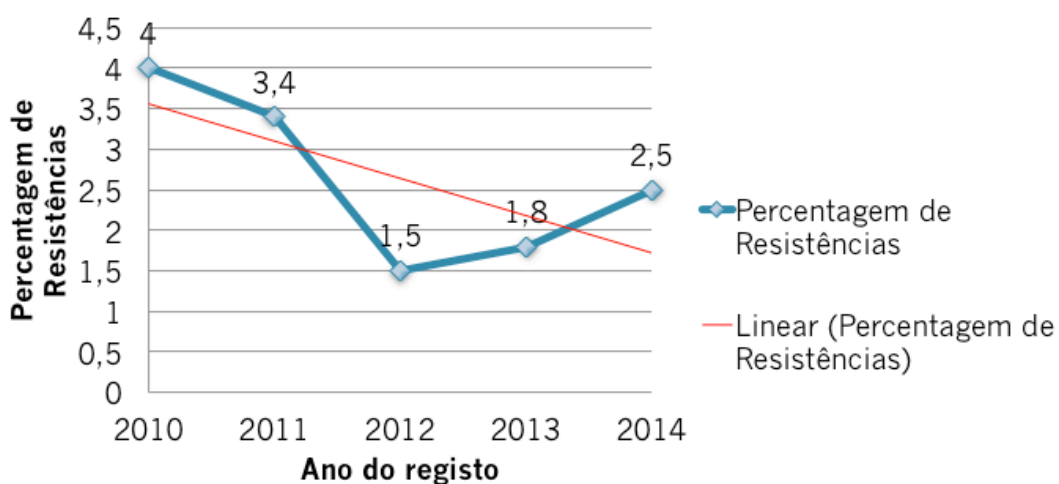


Gráfico 7. Padrão de resistência de *E. coli* à fosfomicina

13. Conclusão

As infecções das vias urinárias são as infecções bacterianas mais frequentes nas mulheres. A maioria das infecções urinárias são cistites agudas não complicadas. Os parâmetros identificadores da cistite aguda não complicada são a polaquiúria e a disúria numa mulher imunocompetente de idade fértil que não tem problemas patológicos ou alterações urológicas. O exame objectivo é habitualmente normal ou revela dor à palpação da região suprapúbica. Para se fazer o diagnóstico está indicada a análise de urina, mas não a urocultura. As normas de orientação recomendam três opções para primeira linha de tratamento da cistite aguda não complicada: fosfomicina, nitrofurantoína e amoxicilina/ ácido clavulânico. As uroculturas estão indicadas nas mulheres com suspeita de pielonefrite, nas que apresentam sintomas que não cedem ou que reaparecem duas a quatro semanas depois de ter terminado o tratamento e nas mulheres que têm sintomas atípicos.

A pielonefrite aguda é uma infecção bacteriana frequente das vias urinárias e do rim que se observa mais frequentemente em mulheres adultas jovens. A história e o exame objectivo são as principais ferramentas para o diagnóstico. A maior parte das doentes tem febre, embora esta possa não existir na fase inicial da doença. A dor lombar é quase universal e a sua ausência deve levar a que se procure uma hipótese diagnóstica alternativa. Uma análise de urina positiva confirma o diagnóstico nos doentes que têm história e exame objectivo compatíveis. Deve fazer-se urocultura em todos os doentes para se orientar a terapêutica com antibióticos quando o doente não responde à terapêutica empírica inicial. A *E. coli* é o agente patogénico mais frequente na pielonefrite aguda e, ao longo da última década, tem aparecido uma taxa crescente de resistências da *E. coli* aos antibióticos betalactâmicos de espectro alargado. A imagiologia não é necessária a menos que se não observe melhoria dos sintomas do doente ou se houver uma recidiva dos sintomas depois de uma melhoria inicial. Na maioria dos doentes o tratamento pode ser feito em ambulatório.

As infecções agudas das vias urinárias são relativamente frequentes nas crianças, havendo 8% das raparigas e 2% dos rapazes com pelo menos um episódio até aos sete anos de idade. O agente patogénico mais frequente é a *E. coli*, que está em cerca de 80% das infecções das vias urinárias nas crianças. Os sinais e os sintomas das infecções das vias urinárias dependem da idade da criança, mas todas as crianças com febre, entre os dois e os 24 meses de idade sem uma causa evidente

de infecção, devem ser avaliadas relativamente à possibilidade de terem uma infecção das vias urinárias. Os antibióticos profiláticos não reduzem o risco de infecção subsequente das vias urinárias, mesmo em crianças com refluxo vesicoureteral ligeiro a moderado. A ecografia, a cistografia e a cintigrafia renal devem ser exames a considerar em crianças com infecções das vias urinárias.

Ao longo desta monografia foram descritos os mecanismos de resistência existentes, quer naturais quer adquiridos. Para tal existem bases genéticas que explicam como é que ocorre a proliferação da resistência bacteriana. O uso inadequado de antibióticos, bem como o não cumprimento da prescrição ajudam à aquisição de resistências. É de extrema importância cumprir com as estratégias traçadas pelas diversas entidades mundiais. Segundo estas, coloca-se a questão se se vive numa era igual à pré-antibiótica, em que era impossível a administração de antibióticos por falta do reconhecimento dos mesmos. No entanto, hoje em dia o problema não se prende com a existência, mas sim com a resistência.

O estudo de caso demonstrou que *E. coli* permanece o microrganismo maioritariamente responsável pela ITU, seguido de *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp. e *Proteus mirabilis*, em infecções urinárias na região de Viseu, estando o estudo de acordo com as tendências mundiais que apontam para prevalências de *E. coli* em infecções urinárias que variam entre 75 e 95%.

Pode-se concluir neste estudo, que as taxas elevadas de resistência de *E. coli* às quinolonas e ao cotrimoxazol (associação de sulfametoxazol e trimetoprim) são concordantes com aquelas descritas em Portugal, provavelmente, consequência dos níveis elevados de utilização destes antibióticos ao longo das últimas décadas.

Concluiu-se ainda que, a nitrofurantoína, quando comparada com os restantes antibióticos foi a que sofreu menor aumento de resistência, o que sublinha a sua potencial acção na profilaxia das infecções urinárias recorrentes.

A fosfomicina, utilizada frequentemente devido ao sucesso da adesão terapêutica, apresenta ainda baixas taxas de resistência na região de Viseu.

14. Bibliografia

1. Naber KG, Schito G, Botto H, Palou J, Mazzei T. Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and Antimicrobial Resistance Epidemiology in Females with Cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. *European Urology*. 2008;54(5):1164-75.
2. Yamamoto S, Higuchi Y, Nojima M. Current therapy of acute uncomplicated cystitis. *International Journal of Urology*. 2010;17(5):450-6.
3. Rodrigues FJ, Barroso AP. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 2011;29(2):123-31.
4. Pereira S. Prevenção das Infecções Urinárias Recorrentes. *Urologia em Medicina Familiar: Associação Portuguesa de Urologia*; 2012 [28 de Julho 2014]. Available from: http://www.apurologia.pt/medicina_familiar/prev-infec-urin-recorr.pdf.
5. Fitzgerald MP, Link CL, Litman HJ, Travison TG, McKinlay JB. Beyond the lower urinary tract: the association of urologic and sexual symptoms with common illnesses. *European Urology*. 2007;52(2):407-15.
6. Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2007;6:4.
7. Alper BS, Curry SH. Urinary tract infection in children. *American Family Physician*. 2005;72(12):2483-8.
8. Utz-Billing I, Kentenich H. Female genital mutilation: an injury, physical and mental harm. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology*. 2008;29(4):225-9.
9. Chen H, Chiu AP, Lam PS, Poon WK, Chow SM, Ng WP, et al. Prevalence of infections in residential care homes for the elderly in Hong Kong. *Hong Kong Medical Journal*. 2008;14(6):444-50.
10. Prentiss KA, Newby PK, Vinci RJ. Adolescent female with urinary symptoms: a diagnostic challenge for the pediatrician. *Pediatric Emergency Care*. 2011;27(9):789-94.
11. Nicolle LE. Empirical treatment of acute cystitis in women. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003;22(1):1-6.
12. Hsueh PR, Hoban DJ, Carmeli Y, Chen SY, Desikan S, Alejandria M, et al. Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region. *The Journal of Infection*. 2011;63(2):114-23.
13. Eiros Bouza JM, Ochoa Sangrador C. [Etiological profile of urinary tract infections and antimicrobial susceptibility of urinary pathogens]. *Anales de Pediatría (Barcelona, Spain : 2003)*. 2007;67(5):461-8.
14. Bader MS, Hawboldt J, Brooks A. Management of complicated urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgraduate Medicine*. 2010;122(6):7-15.
15. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American Journal of Medicine*. 2002;113 Suppl 1A:5s-13s.
16. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Infecções das Vias Urinárias. *Harrison Manual de Medicina*. 17ª ed: McGraw-Hill; 2010. p. 815-20.
17. Mazzulli T. Resistance trends in urinary tract pathogens and impact on management. *The Journal of Urology*. 2002;168(4 Pt 2):1720-2.
18. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-month : DM*. 2003;49(2):53-70.
19. Foxman B. Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors. *American Journal of Public Health*. 1990;80(3):331-3.
20. Ejrnaes K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Danish Medical Bulletin*. 2011;58(4):B4187.

21. Fiore DC, Fox CL. Section four: recurrent urinary tract infection. *FP Essentials*. 2014;416:30-7.
22. Rabiais S, Aragão F, Félix J, Moreira P, Rolo F. Infecção urinária recidivante: ocorrência, factores de risco e custos de diagnóstico e tratamento. *Acta Urológica*. 2010;19–25.
23. Najar MS, Saldanha CL, Banday KA. Approach to urinary tract infections. *Indian Journal of Nephrology*. 2009;19(4):129-39.
24. Bruschi J, Bavaro M, Cunha B, Tessier J, Bronze M. Cystitis in Females 2014 [updated 26 Junho 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/233101-overview - showall>.
25. Litza JA, Brill JR. Urinary tract infections. *Primary Care*. 2010;37(3):491-507, viii.
26. Rolo F. PB, Moreira P. Guia de Prática Clínica – Cistite não complicada na mulher. Associação Portuguesa de Urologia. 2008.
27. Alos JI. [Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community. Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005;23 Suppl 4:3-8.
28. Andreu A, Alos JI, Gobernado M, Marco F, de la Rosa M, Garcia-Rodriguez JA. [Etiology and antimicrobial susceptibility among uropathogens causing community-acquired lower urinary tract infections: a nationwide surveillance study]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005;23(1):4-9.
29. Francisco Rolo BP, Pedro Moreira. Cistite não complicada na mulher. Guia de prática clínica. Associação Portuguesa de Urologia. 2008.
30. Andreu A, Planells I. [Etiology of community-acquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study]. *Medicina Clínica*. 2008;130(13):481-6.
31. Andreu A. [Pathogenesis of urinary tract infections]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005;23 Suppl 4:15-21.
32. Schaeffer AJ. What do we know about the urinary tract infection-prone individual? *The Journal of Infectious Diseases*. 2001;183 Suppl 1:S66-9.
33. Chung A, Arianayagam M, Rashid P. Bacterial cystitis in women. *Australian Family Physician*. 2010;39(5):295-8.
34. Valdevenito SJ. [Recurrent urinary tract infection in women]. *Revista chilena de infectología : Organo Oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*. 2008;25(4):268-76.
35. Bruschi J, Cunha B, Bronze M. Urinary Tract Infection in Males. 2014 [25 de Junho 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/231574-overview - showall>.
36. Weichhart T, Haidinger M, Horl WH, Saemann MD. Current concepts of molecular defence mechanisms operative during urinary tract infection. *European Journal of Clinical Investigation*. 2008;38 Suppl 2:29-38.
37. Grabe CM, Bjerklund Johansen TE, Botto H, Wullt B, Çek M, Naber KG, et al. Guidelines on Urological Infections: European Association of Urology; 2013 [25 de Junho 2014]. Available from: http://www.uroweb.org/gls/pdf/18_Urological_infections_LR.pdf.
38. Tiba MR, Nogueira GP, Leite Dda S. [Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009;42(1):58-62.
39. Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann HW, et al. Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*. 2012;4(4):471-87.
40. Chang SL, Shortliffe LD. Pediatric urinary tract infections. *Pediatric Clinics of North America*. 2006;53(3):379-400, vi.

41. Tabibian JH, Gornbein J, Heidari A, Dien SL, Lau VH, Chahal P, et al. Uropathogens and host characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(12):3980-6.
42. Nosseir SB, Lind LR, Winkler HA. Recurrent uncomplicated urinary tract infections in women: a review. *Journal of Women's Health* (2002). 2012;21(3):347-54.
43. Wagenlehner FM, Weidner W, Naber KG. An update on uncomplicated urinary tract infections in women. *Current Opinion in Urology*. 2009;19(4):368-74.
44. Colgan R, Keating K, Dougouih M. Survey of symptom burden in women with uncomplicated urinary tract infections. *Clinical Drug Investigation*. 2004;24(1):55-60.
45. Nicolle LE. Complicated urinary tract infection in adults. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2005;16(6):349-60.
46. Bent S, Nallamothu BK, Simel DL, Fihn SD, Saint S. Does this woman have an acute uncomplicated urinary tract infection? *JAMA : The Journal of the American Medical Association*. 2002;287(20):2701-10.
47. Brusck JL, Bronze MS. Prevention of Urinary Tract Infections. 2014. [30 de Junho 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/2040239-overview - showall>.
48. Gupta K, Hooton TM, Roberts PL, Stamm WE. Patient-initiated treatment of uncomplicated recurrent urinary tract infections in young women. *Annals of Internal Medicine*. 2001;135(1):9-16.
49. Barry HC, Hickner J, Ebell MH, Ettenhofer T. A randomized controlled trial of telephone management of suspected urinary tract infections in women. *The Journal of Family Practice*. 2001;50(7):589-94.
50. Kunin CM. Guidelines for urinary tract infections. Rationale for a separate strata for patients with "low-count" bacteriuria. *Infection*. 1994;22 Suppl 1:S38-40; discussion S1.
51. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(5):e103-20.
52. Zalmanovici Trestioreanu A, Green H, Paul M, Yaphe J, Leibovici L. Antimicrobial agents for treating uncomplicated urinary tract infection in women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010(10):Cd007182.
53. Martins F, Vitorino J, Abreu A. Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de microrganismos isolados em urinas na Região do Vale do Sousa e Tâmega. *Acta Médica Portuguesa*. 2010;23(4):641-6.
54. Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. Etiologia das infeções do tracto urinário e sua suscetibilidade aos antimicrobianos. *Acta Médica Portuguesa*. 2007;20(6):543-50.
55. Gynecologists. ACoOa. ACOG Practice Bulletin No. 91: Treatment of urinary tract infections in nonpregnant women. *Obstetrics and Gynecology*. 2008;111(3):785-94.
56. DGS. Direcção-Geral da Saúde. Orientação da Direcção-Geral da Saúde nº 015/2011 de 30/08/2011: Terapêutica de infeções do aparelho urinário (comunidade). Lisboa. 2011 [14 de Agosto 2014]. Available from: <http://www.dgs.pt/>.
57. Jepson RG, Williams G, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;10:Cd001321.
58. Brown PD, Freeman A, Foxman B. Prevalence and predictors of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Michigan. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(8):1061-6.

59. Metlay JP, Strom BL, Asch DA. Prior antimicrobial drug exposure: a risk factor for trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant urinary tract infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;51(4):963-70.
60. Colgan R, Johnson JR, Kuskowski M, Gupta K. Risk factors for trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in patients with acute uncomplicated cystitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(3):846-51.
61. Fulop T, Lederer E, Batuman V. Acute Pyelonephritis. 2014. [24 de Junho 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/245559-overview - a0156>.
62. Czaja CA, Scholes D, Hooton TM, Stamm WE. Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45(3):273-80.
63. Zahar JR, Lortholary O, Martin C, Potel G, Plesiat P, Nordmann P. Addressing the challenge of extended-spectrum beta-lactamases. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England : 2000)*. 2009;10(2):172-80.
64. Oteo J, Perez-Vazquez M, Campos J. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2010;23(4):320-6.
65. Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, McCalmont M, Smyth B, Donaghy P, et al. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64(3):635-41.
66. Rodriguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, et al. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Archives of Internal Medicine*. 2008;168(17):1897-902.
67. Scholes D, Hawn TR, Roberts PL, Li SS, Stapleton AE, Zhao LP, et al. Family history and risk of recurrent cystitis and pyelonephritis in women. *The Journal of Urology*. 2010;184(2):564-9.
68. Scholes D, Hooton TM, Roberts PL, Gupta K, Stapleton AE, Stamm WE. Risk factors associated with acute pyelonephritis in healthy women. *Annals of Internal Medicine*. 2005;142(1):20-7.
69. Nicolle LE. Urinary tract infection. *Critical Care Clinics*. 2013;29(3):699-715.
70. Nicolle LE. Complicated pyelonephritis: unresolved issues. *Current Infectious Disease Reports*. 2007;9(6):501-7.
71. Fulop T, Lederer E, Batuman V. Acute Pyelonephritis: The Differential Diagnosis and Workup. 2014. [24 Junho de 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/245559>.
72. Ubee SS, McGlynn L, Fordham M. Emphysematous pyelonephritis. *BJU International*. 2011;107(9):1474-8.
73. Longo D.L., Kasper D.L., Fauci A.S., Hauser S.L., Jameson J.L., Loscalzo J. Urinary Tract Infections, Pyelonephritis, and Prostatitis. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 1. 18^a ed: McGraw-Hill; 2012. p. 2387-95.
74. Criteria. ACoRAA. Acute pyelonephritis.: American College of Radiology. ACR Appropriateness Criteria.; 2012 [updated 24 Junho de 2014]. Available from: <http://www.acr.org/~media/ACR/Documents/AppCriteria/Diagnostic/AcutePyelonephritis.pdf>.
75. Mitterberger M, Pinggera GM, Colleselli D, Bartsch G, Strasser H, Steppan I, et al. Acute pyelonephritis: comparison of diagnosis with computed tomography and contrast-enhanced ultrasonography. *BJU International*. 2008;101(3):341-4.
76. Van Nieuwkoop C, Hoppe BP, Bonten TN, Van't Wout JW, Aarts NJ, Mertens BJ, et al. Predicting the need for radiologic imaging in adults with febrile urinary tract infection. *Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;51(11):1266-72.

77. Chen Y, Nitzan O, Saliba W, Chazan B, Colodner R, Raz R. Are blood cultures necessary in the management of women with complicated pyelonephritis? *The Journal of Infection*. 2006;53(4):235-40.
78. Williams G, Craig JC. Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011(3):Cd001534.
79. DGS. Direcção-Geral da Saúde. Orientação da Direcção-Geral da Saúde nº 008/2012 de 16/12/2012: Diagnóstico e Tratamento da Infecção do Tracto Urinário em Idade Pediátrica. Lisboa. 2012 [23 de Agosto 2014]. Available from: <http://www.dgs.pt/>.
80. Zorc JJ, Levine DA, Platt SL, Dayan PS, Macias CG, Krief W, et al. Clinical and demographic factors associated with urinary tract infection in young febrile infants. *Pediatrics*. 2005;116(3):644-8.
81. Roberts KB. Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2 to 24 months. *Pediatrics*. 2011;128(3):595-610.
82. Montini G, Zucchetto P, Tomasi L, Talenti E, Rigamonti W, Picco G, et al. Value of imaging studies after a first febrile urinary tract infection in young children: data from Italian renal infection study 1. *Pediatrics*. 2009;123(2):e239-46.
83. Fisher DJ, Steele RW, Barton LL, Egland AG, Egland TG, Hellerstein S, et al. Pediatric Urinary Tract Infection: the prognosis. 2014. [24 Junho de 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/969643>.
84. Fisher DJ, Steele RW, Barton LL, Egland AG, Egland TG, Hellerstein S, et al. Pediatric Urinary Tract Infection: the practice essentials and etiology. 2014. [24 Junho de 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/969643>.
85. Finnell SM, Carroll AE, Downs SM. Technical report-Diagnosis and management of an initial UTI in febrile infants and young children. *Pediatrics*. 2011;128(3):e749-70.
86. Shaikh N, Morone NE, Bost JE, Farrell MH. Prevalence of urinary tract infection in childhood: a meta-analysis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2008;27(4):302-8.
87. National Collaborating Centre for Ws, Children's H. National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. Urinary Tract Infection in Children: Diagnosis, Treatment and Long-term Management. London: RCOG Press National Collaborating Centre for Women's and Children's Health; 2007.
88. Etoubleau C, Reveret M, Brouet D, Badier I, Brosset P, Fourcade L, et al. Moving from bag to catheter for urine collection in non-toilet-trained children suspected of having urinary tract infection: a paired comparison of urine cultures. *The Journal of Pediatrics*. 2009;154(6):803-6.
89. ACR Appropriateness Criteria: Urinary Tract Infection - Child [Internet]. American College of Radiology. 2012 [cited 1 de Julho de 2014]. Available from: <http://www.acr.org/~media/ACR/Documents/AppCriteria/Diagnostic/UrinaryTractInfectionChild.pdf>.
90. Fisher DJ, Steele RW, Barton LL, Egland AG, Egland TG, Hellerstein S, et al. Pediatric Urinary Tract Infection: the workup and the differential diagnoses. 2014. [24 Junho de 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/969643>.
91. ACR-SPR Practice Guideline for the Performance of Voiding Cystourethrography in Children [Internet]. American College of Radiology,. 2009 [cited 1 de Julho de 2014]. Available from: http://www.acr.org/~media/ACR/Documents/PGTS/guidelines/Voiding_Cystourethrography.pdf.
92. Fitzgerald A, Mori R, Lakhanpaul M, Tullus K. Antibiotics for treating lower urinary tract infection in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;8:Cd006857.

93. Peres M, FI, Pacheco M., Leça A. et al. Nefro-Urologia: Infecção urinária. In: Amaral JMV, editor. Tratado de Clínica Pediátrica. Volume 2. 2ª Edição ed: Abbott Laboratórios, Lda; 2013. p. 785-95.
94. Conway PH, Cnaan A, Zaoutis T, Henry BV, Grundmeier RW, Keren R. Recurrent urinary tract infections in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*. 2007;298(2):179-86.
95. Edlin RS, Copp HL. Antibiotic resistance in pediatric urology. *Therapeutic Advances in Urology*. 2014;6(2):54-61.
96. Montini G, Rigon L, Zucchetto P, Fregonese F, Toffolo A, Gobber D, et al. Prophylaxis after first febrile urinary tract infection in children? A multicenter, randomized, controlled, noninferiority trial. *Pediatrics*. 2008;122(5):1064-71.
97. Craig JC, Simpson JM, Williams GJ, Lowe A, Reynolds GJ, McTaggart SJ, et al. Antibiotic prophylaxis and recurrent urinary tract infection in children. *The New England Journal of Medicine*. 2009;361(18):1748-59.
98. Cheng CH, Tsai MH, Huang YC, Su LH, Tsau YK, Lin CJ, et al. Antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in children with vesicoureteral reflux receiving prophylactic antibiotic therapy. *Pediatrics*. 2008;122(6):1212-7.
99. Braga LH, Mijovic H, Farrokhyar F, Pemberton J, DeMaria J, Lorenzo AJ. Antibiotic prophylaxis for urinary tract infections in antenatal hydronephrosis. *Pediatrics*. 2013;131(1):e251-61.
100. Pennesi M, Travan L, Peratoner L, Bordugo A, Cattaneo A, Ronfani L, et al. Is antibiotic prophylaxis in children with vesicoureteral reflux effective in preventing pyelonephritis and renal scars? A randomized, controlled trial. *Pediatrics*. 2008;121(6):e1489-94.
101. Mattoo TK. Evidence for and against urinary prophylaxis in vesicoureteral reflux. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*. 2010;25(12):2379-82.
102. Robinson J. Antibiotic prophylaxis in vesicoureteral reflux: A practice revisited. *Canadian Pharmacists Journal: CPJ*. 2013;146(2):84-7.
103. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*. 2006;119(6 Suppl 1):S20-8; discussion S62-70.
104. Hernandez-Gomez C, Blanco VM, Motoa G, Correa A, Vallejo M, Villegas MV. [Evolution of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli from intensive care units in Colombia]. *Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud*. 2014;34 Suppl 1:91-100.
105. Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*. 2009;180(4):408-15.
106. Reddy P, Chadaga S, Noskin GA. Antibiotic considerations in the treatment of multidrug-resistant (MDR) pathogens: a case-based review. *Journal of hospital medicine: an official publication of the Society of Hospital Medicine*. 2009;4(6):E8-15.
107. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*. 2014;14:13.
108. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2012;27(2):128-42.
109. Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012;2012:976273.
110. Dalhoff A. Resistance surveillance studies: a multifaceted problem--the fluoroquinolone example. *Infection*. 2012;40(3):239-62.
111. Li D, Renzoni A, Estoppey T, Bisognano C, Francois P, Kelley WL, et al. Induction of fibronectin adhesins in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by sigma B transcription factor activity is

mediated by two separate pathways. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(3):916-24.

112. Dzidic S., Suskovic J., Kos B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology*. 2008;46(1):11-21.

113. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(1):36-45.

114. Hartl DL, Jones EW. Genetics of Bacteria and Their Viruses. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. 5^a ed: Jones and Bartlett Publishers; 2001. p. 392-443.

115. Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Werner G, Sundsfjord A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(6):541-54.

116. Mayer G. Exchange of Genetic Information: Microbiology and Immunology; 2010. [2 de Julho de 2014]. Available from: http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/genetic_ex.htm.

117. Hartl DL, Jones EW. Molecular Mechanisms of Mutation and DNA Repair. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. 5^a ed: Jones and Bartlett Publishers; 2001. p. 264-309.

118. Martinez-Martinez L, Calvo J. [Development of resistances to antibiotic drugs: causes, consequences and importance to the public health system]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. 2010;28 Suppl 4:4-9.

119. University MS. Molecular mechanisms of resistance Antimicrobial resistance learning site: Michigan State University; 2011 [4 de Julho de 2014]. Available from: <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance>.

120. Pérez C. Resistencia bacteriana: SusMedicos.com; 2007 [4 de Julho de 2014]. Available from: http://www.susmedicos.com/art_Resistencia_Bacteriana.htm.

121. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362(19):1804-13.

122. S.a. Antibiotic resistance: mechanisms of antibiotic resistance. *Encyclopedia Britannica Online*. 2012 [4 de Julho de 2014]. Available from: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/129670/There-are-multiple-mechanismsby-which-bacteria-can-develop-resistance>.

123. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014.

124. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1794(5):808-16.

125. INSA. Resistência aos antimicrobianos.: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.; 2010 [25 de Junho de 2014]. Available from: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/DoencasInfecciosas/AreasTrabalho/ResistencAnti/Paginas/inicial.aspx>.

126. Kahlmeter G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe. The ECO.SENS study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003;22 Suppl 2:49-52.

127. ESAC. European Surveillance of Antimicrobial Consumption. Final management report 2009-2010. 2011 [23 de Julho 2014]. Available from: http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50031.

128. ECDPC. Health. European centre for disease prevention and control.: Antimicrobial resistance surveillance in Europe; 2012 [5 de Julho de 2014]. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>.

129. European Centre for Disease Prevention and Control. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data: ECDPC; 2011 [20 de Junho de 2014]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf.
130. Cars O, Molstad S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet*. 2001;357(9271):1851-3.
131. ECDPC. Health. European centre for disease prevention and control.: Antimicrobial resistance surveillance in Europe.; 2011 [5 de Julho de 2014]. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>.
132. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(1):54-61.
133. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(2):165-74.
134. Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;60(6):1370-4.
135. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Infecções Associadas a Cuidados de Saúde. *Harrison Manual de Medicina*. 17ª ed: McGraw-Hill; 2010. p. 428-32.
136. Nicolle LE. The prevention of hospital-acquired urinary tract infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(2):251-3.
137. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal of Infection Control*. 2008 (update 2012);36(5):309-32.
138. Chenoweth CE, Saint S. Urinary tract infections. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2011;25(1):103-15.
139. Amzian K, Rossello J, Castella A, Sekkat S, Terzaki S, Dhidah L, et al. [Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region]. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2010;16(10):1070-8.
140. Esposito S, Noviello S, Leone S. [Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology and prevention]. *Le Infezioni in Medicina: Rivista Periodica di Epidemiologia, Epidemiologia, Diagnostica, Clinica e Terapia delle Patologie Infettive*. 2008;16(3):130-43.
141. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(5):625-63.
142. Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infection control and hospital epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2010;31(4):319-26.
143. Trautner BW. Management of catheter-associated urinary tract infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2010;23(1):76-82.
144. Conway LJ, Larson EL. Guidelines to prevent catheter-associated urinary tract infection: 1980 to 2010. *Heart & lung: The Journal of Critical Care*. 2012;41(3):271-83.

145. Seguin P, Laviolle B, Isslame S, Coue A, Malledant Y. Effectiveness of simple daily sensitization of physicians to the duration of central venous and urinary tract catheterization. *Intensive Care Medicine*. 2010;36(7):1202-6.
146. Meddings J, Rogers MA, Macy M, Saint S. Systematic review and meta-analysis: reminder systems to reduce catheter-associated urinary tract infections and urinary catheter use in hospitalized patients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;51(5):550-60.
147. Loeb M, Hunt D, O'Halloran K, Carusone SC, Dafoe N, Walter SD. Stop orders to reduce inappropriate urinary catheterization in hospitalized patients: a randomized controlled trial. *Journal of General Internal Medicine*. 2008;23(6):816-20.
148. Crouzet J, Bertrand X, Venier AG, Badoz M, Husson C, Talon D. Control of the duration of urinary catheterization: impact on catheter-associated urinary tract infection. *The Journal of Hospital Infection*. 2007;67(3):253-7.
149. Tenke P, Koves B, Johansen TE. An update on prevention and treatment of catheter-associated urinary tract infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2014;27(1):102-7.
150. Mehnert-Kay SA. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *American Family Physician*. 2005;72(3):451-6.
151. Hooton TM, Besser R, Foxman B, Fritsche TR, Nicolle LE. Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empirical therapy. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of The Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(1):75-80.
152. Katsarolis I, Poulakou G, Athanasia S, Kourea-Kremastinou J, Lambri N, Karaiskos E, et al. Acute uncomplicated cystitis: from surveillance data to a rationale for empirical treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(1):62-7.
153. Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;51(1):69-76.

15. Anexo: Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

15.1. Resumo

Pretende-se com este relatório de estágio descrever de forma sucinta todo o trabalho desenvolvido ao longo dos últimos seis meses no laboratório de Análises Clínicas R&S S.A. em Sátão, no âmbito do estágio final para a obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Os meios complementares de diagnóstico são, nos tempos actuais, uma importante área da medicina, complementando-se entre eles, e com as próprias ciências médicas com o objectivo principal de melhorar e garantir uma mais saudável qualidade de vida aos utentes.

Irei ao longo das próximas páginas abordar de forma genérica todas as áreas de trabalho num laboratório, focando-me principalmente nas duas áreas em que desenvolvi maior actividade: Hematologia e Imunologia/Endocrinologia.

15.2. Abstract

The aim of this report is to briefly describe all the work that has been developed in the last six months at the R&S S.A. Laboratories in Sátão, as part of the final internship in the Master of Clinical Sciences by the Faculty of Pharmacy of the University of Porto.

The complementary diagnostics methods are, in the current time, an important field of medicine that complements the medical sciences with the main goal to improve and guarantee a healthy quality life to the patients.

In the next pages, I will approach the different fields of work in a laboratory focusing mainly in two areas where I've developed most of my activity: Hematology and Immunology/Endocrinology.

15.3. Introdução

Os meios complementares de diagnóstico aplicados na saúde são uma área científica indispensável à investigação clínico-laboratorial, com a finalidade de dar suporte e viabilizar um correcto diagnóstico, tratamento e prevenção da doença no indivíduo e na comunidade. Este é o papel dos profissionais de Análises Clínicas integrados em equipas multidisciplinares, que desenvolvem a sua actividade ao nível da Patologia Clínica, através do estudo, da aplicação e da avaliação das técnicas e métodos analíticos próprios, com fins de diagnóstico e de rastreio. (Mesquita & Pimentel, 2000)

Neste contexto, e utilizando as valências profissionais adquiridas durante o mestrado integrado em ciências farmacêuticas, decidi seguir a minha área de estudo nas análises clínicas. Este estágio curricular faz parte integral do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, iniciado no ano lectivo 2012/2013; foi desenvolvido entre Novembro de 2013 e Junho de 2014 no laboratório A.C. R&S S.A. no Sátão e realizado sob orientação da Dra. Maria Eugénia Rapazote Flores, especialista pela Ordem dos Farmacêuticos em Análises Clínicas e directora técnica do laboratório onde decorreu o estágio.

O laboratório A.C. R&S S.A. é certificado pela norma NP EN ISO 9001:2008 cumprindo todos os requisitos da mesma e do manual das boas práticas laboratoriais da Ordem dos Farmacêuticos, e conta com 8 postos de colheitas distribuídos por seis concelhos do distrito de Viseu (Sátão, V. N. Paiva, Penedono, Sernancelhe, Moimenta da Beira, Tarouca e Viseu) e no distrito da Guarda (Aguar da Beira). Conta com um fluxo médio de 90 utentes por dia, apresentado ainda um pequeno volume de cerca de 5 amostras veterinárias por dia provenientes de duas clínicas veterinárias da Vila do Sátão. Apresenta uma equipa multidisciplinar, constituída por bioquímicos, farmacêuticos e técnicos de análises clínicas e permitiu-me durante o estágio desenvolver competências no âmbito da Hematologia, Coagulação, Química Clínica, Imunologia, Endocrinologia e Microbiologia, possibilitando deste modo complementar e consolidar os conhecimentos teóricos e práticos previamente adquiridos, assim como fazer parte da equipa de trabalho na rotina diária e contactar directamente com a prática laboratorial, e a biovalidação final de resultados analíticos.

Durante a realização do estágio foram planificados objectivos concretos: consolidar os conceitos e conteúdos apreendidos durante o período teórico das aulas, actuar com elevado perfil ético e deontológico, desempenhar correctamente e ajudar a melhorar as três etapas que constituem o processo analítico (fase pré-analítica, fase

analítica e fase pós analítica); desenvolver competências específicas necessárias para analisar, concluir e decidir; analisar criticamente e reflexivamente os resultados obtidos, tendo em conta sempre a avaliação clínica do paciente. Todas as áreas do laboratório foram cobertas pelo estágio, tendo sido aprofundados os meus conhecimentos práticos em duas áreas clínicas específicas: Hematologia (capítulo 17.5.1.) com a utilização do Sysmex XT1800i® e Imunologia/Endocrinologia (capítulo 17.5.3.) com a utilização dos instrumentos Vidas®, Elecsys 2010® e Cobas e601®, que serão descritas com mais pormenor durante este relatório de estágio.

O Laboratório de Análises Clínicas R&S SA, apresenta dois pisos distintos. No piso 0, destinado ao contacto com os utentes, existe uma sala de recepção, duas salas de colheitas, e todos os meios indispensáveis para o correcto funcionamento da fase pré-analítica. No 1º piso encontramos o laboratório propriamente dito, onde são efectuadas todos os procedimentos analíticos relativos aos serviços requisitados. Um *software* informático é comum a todo o laboratório. O utilizador é identificado por palavra passe o que permite não só uma rastreabilidade de amostras como também o acesso à identificação do utente, ao seu histórico, ao registo do controlo de qualidade e a todo um conjunto de parâmetros essenciais à fluidez do processo laboratorial.

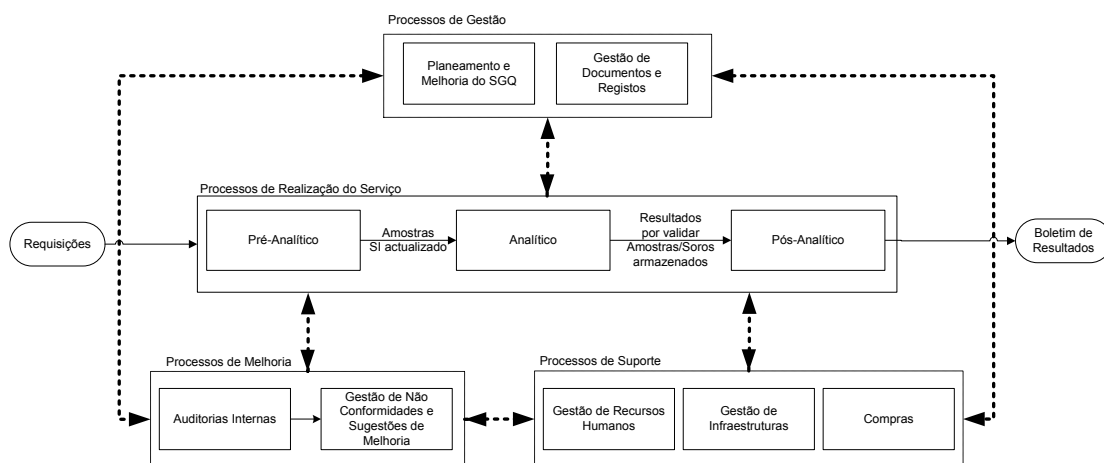


Figura 1- Rede integrada de processos em vigor no laboratório A.C. R&S SA

Apresenta também uma rede de processos para controlar todo o procedimento laboratorial que engloba a realização de análises clínicas (desde o primeiro contacto com o utente até à entrega dos resultados laboratoriais). (Fig. 1) A melhoria contínua no Laboratório R&S SA, é baseada no Ciclo de Melhoria PDCA: (*Plan-Do-Check-Act*) Planear, Implementar, Verificar e Actuar. Todo o processo de execução analítica assenta em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós analítica.

15.4. Fase Pré – Analítica

A fase pré-analítica compreende as operações que antecedem a análise laboratorial. Fazem parte desta fase o contacto directo com o utente, a colheita e transporte da amostra biológica, recepção dos vários produtos biológicos, fase de identificação e registo do produto, verificação do pedido de análises e processamento da amostra. Para identificação das amostras são utilizados códigos de barras com o nome do paciente e informação para o serviço onde se destina, eliminando assim possíveis erros que possam surgir após uma incorreta identificação das amostras.

A colheita de amostras biológicas destinadas a exames laboratoriais, constitui uma das importantes etapas da fase pré-analítica. A maior percentagem de erros surge nesta fase, e uma colheita mal efectuada, é muitas vezes a causa de resultados inexactos e imprecisos, e pode não ser possível a validação final de resultados a nível biopatológico. (Gomes, 2008)

A primeira abordagem ao paciente é a identificação deste, usando para isso um documento oficial ou um documento interno do laboratório utilizado para esse fim, após esse procedimento efectua-se o registo no sistema informático dos dados do paciente e da requisição por este apresentada (requisição médica, requisição oral pelo paciente, etc.) e claramente se identifica o documento que vai servir de base para todo o processo analítico. Seguidamente faz-se a recolha do produto biológico a analisar.

De forma sucinta, descrevem-se os procedimentos para a correcta colheita de produtos biológicos nesta fase. A colheita de sangue é feita por punção venosa percutânea das veias periféricas utilizando o sistema *Vacurette*[®] - método de vácuo, ou seringa. Devido às especificidades analíticas de cada procedimento, o tubo de recolha a ser utilizado e o anticoagulante específico deverão ser escolhidos nesta fase. A colheita de urina para realização da análise sumária da mesma é realizada para recipiente estéril e, quando é requisitada urocultura e eventual antibiograma, a urina é recolhida após higienização do meato urinário com um toalhete bactericida e após descarte do jacto inicial de urina. Esta colheita é feita preferencialmente no espaço físico do laboratório ou dos postos de colheitas. A colheita de outros fluidos corporais específicos (exsudados, expectoração, esperma, cabelos, unhas, etc.) são realizadas de acordo com procedimentos próprios, podendo recorrer-se a dispositivos médicos específicos ou outros materiais cirúrgicos de extracção.

As amostras são depois acondicionadas devidamente, sujeitas a vários procedimentos (centrifugação, confirmação de pedido, etc.) e devidamente enviadas ao laboratório (no caso de provirem de postos de colheitas) em contentores

estanques, devidamente refrigerados e ao abrigo da luz. Uma vez no laboratório são novamente verificadas e separadas para os diferentes serviços onde serão utilizadas. Pontualmente pode sugerir a necessidade de contacto do utente, solicitando uma nova colheita, quando as características do produto recolhido não reúnem as condições de processamento laboratorial.

15.5. Fase Analítica

A fase analítica corresponde ao procedimento analítico em si, e a todas as técnicas, mecanismos e avaliações inerentes ao processo. Em seguida, de forma sucinta, irei abordar todas as áreas percorridas durante o estágio, aprofundando teoricamente aquelas onde desenvolvi maior actividade: Hematologia (capítulo 17.5.1.) e Imunologia/Endocrinologia (capítulo 17.5.3.).

15.5.1. Hematologia

A hematologia compreende o estudo do sangue e dos tecidos hematopoiéticos que correspondem a um dos maiores sistemas orgânicos do Homem. O sangue constitui cerca de 6 a 8% da massa corporal total e consiste em células sanguíneas suspensas num fluido denominado plasma. Os principais tipos de células sanguíneas são os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. O plasma perfaz cerca de 45 a 60% do volume total sanguíneo e os eritrócitos ocupam grande parte do volume restante. Os leucócitos e as plaquetas, embora fisiologicamente importantes, ocupam um volume significativamente menor.

A hematologia de rotina é uma das áreas mais requisitadas pelos clínicos. Dentro de um laboratório, esta inclui algumas das análises mais pedidas: hemograma, contagem de plaquetas e velocidade de sedimentação. Os resultados obtidos revestem-se de extrema importância especialmente em conjugação com os resultados provenientes das restantes áreas. Estas determinações são efectuadas no laboratório A.C. R&S SA através de: métodos automáticos (para o hemograma e contagem de plaquetas utiliza-se um Sysmex XT-1800i[®], para o cálculo da velocidade de sedimentação utiliza-se o Vestmatic-30[®]); métodos semi-automáticos (para determinações na área da coagulação, onde o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial activado são determinados utilizando um Option 4 Plus[®]) e métodos manuais (para a contagem de reticulócitos, grupo sanguíneo, factor Rh, entre outras).

15.5.1.1. Contador Hematológico - Sysmex XT-1800i[®]

No Sysmex XT-1800i[®] (Fig. 2), são executados os pedidos de hemograma (eritrograma e leucograma) e contagem de plaquetas. Para isso, utiliza-se amostras

de sangue total colhido em tubos de EDTA K₃. A amostra uma vez dentro do aparelho, será dividida em 4 partes para executar 4 diluições diferentes e seguir para os respectivos canais diferenciados (Tab. I). O princípio básico para a contagem celular no analisador Sysmex XT-1800i[®] é a citometria de fluxo.

Tabela I - Canais diferenciais de análise

Canais Sysmex XT 1800i[®]
Canal HGB – diluição 1:375
Canal RBC/PLT – diluição 1:500
Canal 4DIFF – diluição 1:52
Canal WBC/BASO – diluição 1:50



Figura 2 – Sysmex XT 1800i[®]

Canal HGB

A metodologia utilizada neste canal permite-nos fazer a determinação da hemoglobina. O método SLS-Hb, tal como o nome indica, usa o surfactante laurilsulfato de sódio (SLS), evitando o uso de cianeto. A reacção ocorre pela ordem descrita na tabela II, após aspiração e diluição. A quantificação é feita pela leitura da absorvância do pico a 535nm e do pico adjacente a 560nm. (Sysmex Company, 2004)

Tabela II
Ordem de reacções do canal HGB

1 °	Hemólise dos eritrócitos;
2 °	Alteração da conformação da molécula de globulina;
3 °	Oxidação do ferro;
4 °	Formação do complexo SLS-Hb

Canal RBC/PLT

O XT-1800i[®] conta e detecta o tamanho dos eritrócitos e plaquetas usando o método da focagem hidrodinâmica (HDF). O objectivo da HDF é reduzir a perda e variação de pulsos devido à passagem não axial na zona de detecção e recirculação de células, os quais podem causar falsas contagens celulares. Neste método, as partículas, sob uma ligeira pressão, são injectadas a partir da abertura formando uma coluna de partículas. Esta coluna é rodeada pelo diluente, obrigando a um alinhamento partícula a partícula servindo assim de guia para a passagem das mesmas pelo orifício e subsequentemente pelo tubo de captura. (Sysmex Company,

2004) Neste canal obtém-se a contagem de eritrócitos, plaquetas, o volume globular médio e o volume plaquetário médio.

Canal 4DIFF

O papel do surfactante, usado como primeiro reagente, consiste na lise e colapso dos eritrócitos e plaquetas e na abertura de poros nas membranas dos glóbulos brancos. A seguir, o corante de polimetina migra para dentro dos leucócitos danificados e liga-se aos ácidos nucleicos e organitos citoplasmáticos. Quando expostos à luz do laser a 633nm, a intensidade de fluorescência é proporcional ao conteúdo em ácidos nucleicos. Posteriormente, um ácido orgânico liga-se especificamente aos grânulos dos eosinófilos, permitindo a sua diferenciação dos neutrófilos através de um sinal superior de *side scatter*. Posteriormente, o aparelho diferencia os leucócitos em 4 tipos: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos utilizando os respectivos sinais de *side scatter*. (Sysmex Company, 2004)

Canal WBC/BASO

Neste canal, o Sysmex XT-1800i[®] usa os sinais *forward* e *side scatter*. Um reagente ácido provoca uma lise fazendo diminuir os eritrócitos e plaquetas e reduz os leucócitos a simples núcleos, com exceção dos basófilos, permitindo a contagem do número total de leucócitos e a contagem de basófilos. (Sysmex Company, 2004) A redução de tamanho dos eritrócitos e plaquetas e a passagem dos leucócitos (com exceção dos basófilos) a simples núcleos é feita, novamente por um surfactante. As diferenças volumétricas resultantes entre os basófilos e as restantes células são analisadas a partir das informações provindas dos feixes *forward scatter* e *side scatter*. Os dois feixes fazem também a diferenciação entre as células de tamanho menor anucleadas e as células nucleadas. O somatório das informações obtidas vai resultar na contagem do número total de leucócitos e a contagem do número de basófilos.

15.5.1.2. Interpretação de Hemogramas

Os eritrócitos são as células responsáveis pela oxigenação tecidual. São células anucleadas, provenientes da eritropoiese e apresentam no seu conteúdo celular hemoglobina, molécula responsável pelo transporte de oxigénio.

Os eritrócitos definem-se por três parâmetros quantitativos principais: o hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos. Três índices adicionais permitem descrever características qualitativas médias e incluem o Volume Globular Médio (VGM), a Hemoglobina Globular Média (HGM), e a Concentração Média da Hemoglobina Globular (CMHG).

Tabela III - **Classificação de anemia atendendo ao volume eritrocitário médio**

Classe de Anemia	Patologia Associada
Microcíticas (VCM <80 fL)	Ferropenias, talassemias sideróblásticas congénitas ou tóxicas, atransferrinemia, síntese deficiente de hemoglobina
Normocíticas (VCM 80-105 fL)	Gravidez, doenças crónicas, aplasias
Macrocíticas (VCM >100 fL)	Défice de ácido fólico ou vitamina B12, destruição hemolítica crónica, alcoolismo, tabagismo, hipotireoidismo, hepatopatias

A anemia pode ser considerada como uma redução na massa eritrocitária, levando a uma menor capacidade de transporte de oxigénio para atender às necessidades tecidulares. Esta redução de massa pode ocorrer quando a produção de eritrócitos é deficitária ou quando a sua destruição ou perda excede a capacidade de reposição da medula óssea. (Hoffbrand, Moss, & Pettit, 2006)

As anemias podem ser classificadas com base na concentração de hemoglobina dos eritrócitos, no tamanho dos eritrócitos (Tab. III) ou na categoria do distúrbio responsável pela anemia (distúrbios da eritropoiese, perda excessiva de eritrócitos e distribuição anormal dos eritrócitos) (Tab. IV).

A caracterização dos tipos e da gravidade da anemia é assim determinada pela concentração da hemoglobina e restantes índices anteriormente referidos. A produção de eritrócitos é avaliada pela contagem de reticulócitos, que avalia o número de eritrócitos funcionais produzidos pela medula óssea. O esfregaço de sangue periférico é um dos exames laboratoriais mais importantes na avaliação de qualquer paciente com anemia, fornecendo muitos indícios sobre a sua etiologia. Os exames laboratoriais que permitem classificar uma anemia são variados e o seu pedido depende do nível de suspeita do clínico relativamente à sua etiologia.

A anemia por deficiência de ferro é o tipo de anemia mais comum e é observada frequentemente durante a infância, adolescência e gravidez, onde as necessidades de ferro são maiores. Em indivíduos adultos a perda crónica de ferro (ou a má absorção deste) é comum, sendo as causas principais alterações a nível gastrointestinal e a nível genito-urinário.

Tabela IV - **Classificação de anemia atendendo ao distúrbio responsável pela origem**

Classe de Anemia	Causa	Patologia Associada
Produção deficiente ao nível da medula óssea (hipoproliferação)	Danos na medula óssea	Anemia aplástica, infiltração/ fibrose, anemia causada por um tumor
	Deficiência de ferro leve a moderada	Doença de Crohn
	Inadequada estimulação de EPO	Inflamação, condições metabólicas (ex. hipotireoidismo), doença renal, anemia causada por um tumor
Alteração na maturação dos eritrócitos (eritropoiese deficiente)	Defeitos ao nível do citoplasma	Deficiência de ferro severa e prolongada, talassemia, anemia sideroblástica
	Defeitos ao nível do núcleo	Falta de folato, falta de vitamina B12, toxicidade de alguns medicamentos
Baixa sobrevivência dos glóbulos vermelhos	Hemólise (lise dos glóbulos vermelhos)	Anemia aplástica, infiltração/ fibrose, anemia causada por um tumor
Perda de sangue	Hemorragia	Por exemplo, devido a um sangramento excessivo durante a menstruação (menorragia), cancro do cólon

Para permitir uma correcta avaliação da classe de anemia podem ser pedidos doseamentos complementares. Doseamento de ferritina, ácido fólico, vitamina B12, transferrina, ferro sérico, taxa de saturação de transferrina e capacidade total de fixação do ferro, entre outros, são de extrema importância no diagnóstico.

Os leucócitos existentes no sangue periférico normal representam três populações celulares importantes e morfologicamente distintas: granulócitos, linfócitos e monócitos, e são, no sentido lato, as células responsáveis pela manutenção do sistema imunitário no Homem. Pode ainda ser considerado normal a presença de um número baixo de leucócitos circulantes em penúltimo estadio de diferenciação.

O leucograma diferencial fornece as proporções dos diferentes tipos celulares que constituem o número total de leucócitos. Em muitas situações neoplásicas, inflamatórias e imunológicas, as proporções celulares podem surgir alteradas, apesar de uma contagem total inalterada. O aumento do número de leucócitos designa-se leucocitose que resulta, na maioria dos casos, do aumento do número de neutrófilos. As infecções do tipo bacterianas estão normalmente associadas a neutrofilia, infecções víricas a linfocitose e infecções parasitárias e doenças alérgicas a eosinofilia. A diminuição do número de leucócitos designa-se por leucopenia resulta geralmente de uma diminuição do número de neutrófilos.

As plaquetas exercem duas funções diferentes: protegem a integridade do endotélio vascular e iniciam o reparo quando as paredes dos vasos são danificadas, esta interacção é denominada por hemostase primária e é essencial na manutenção de todo o sistema vascular.

A contagem de plaquetas em número aumentado designa-se por trombocitose e em número reduzido designa-se por trombocitopenia. Ambas as alterações podem surgir a partir de etiologias várias.

15.5.1.3. Interpretação de Histogramas

O resultado de um pedido de hemograma e plaquetas (Fig. 3) é composto como já referido por eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas.

Na eventualidade de estarmos perante um hemograma com alterações, surgem as mensagens de aviso respectivas (flags), que permitem chamar a atenção para resultados fora dos valores de referência ou alterações nos histogramas que evidenciam possíveis alterações morfológicas. A continuação do estudo do hemograma é feita, geralmente, através da observação de esfregaço de sangue periférico, através da interpretação de histogramas e, por interacção com resultados obtidos de outras secções analíticas.

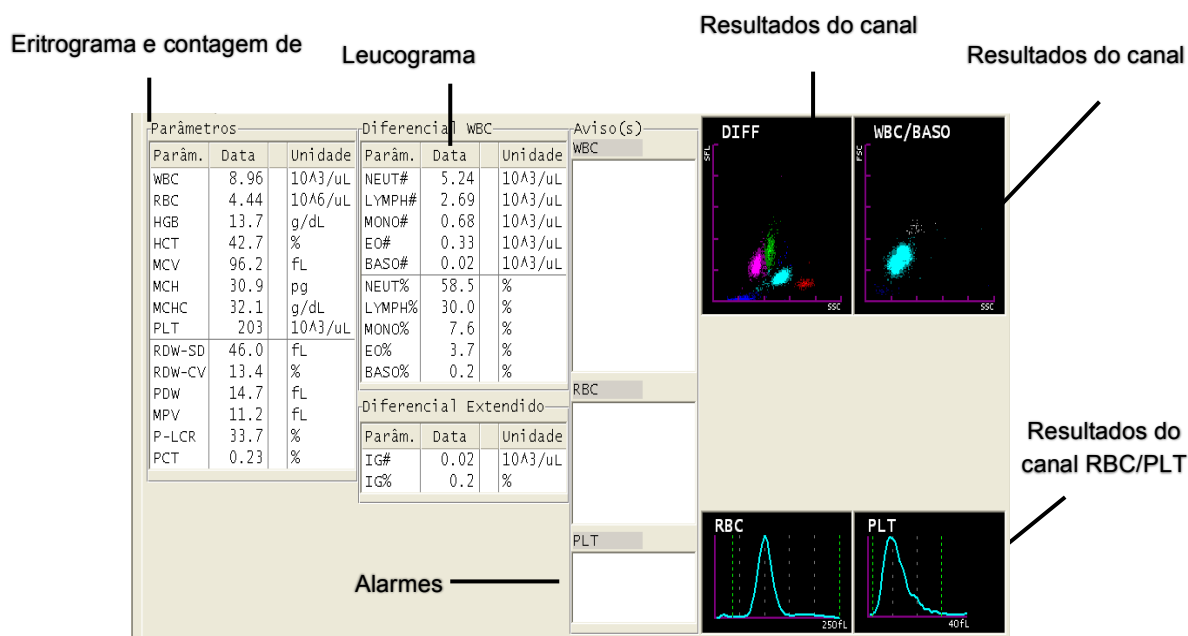


Figura 3

Resultado obtido após realização de hemograma a um paciente sem alterações. As indicações na figura representam a informação obtida a partir da vista geral/gráfica de cada hemograma

Vários factores podem levar a alterações no hemograma, sem que isso represente o estado patológico do paciente. A realização e posterior validação de hemogramas, está sujeita assim a inúmero factores que são necessários avaliar nesse processo. Uma contagem falsamente elevada de eritrócitos pode ocorrer pela presença de eritrócitos não lisados, assim como pela precipitação de proteínas em pacientes com mieloma múltiplo. O aumento dos níveis de crioglobulina (decorrente de mieloma, carcinoma, leucemia, macroglobulinemia, distúrbios linfoproliferativos, tumores metastáticos, doenças auto-imunes, infecções, aneurisma, gravidez, fenómenos tromboembólicos, diabetes, etc.), podem elevar as contagens de eritrócitos e diminuir as de leucócitos ou plaquetas. A amostra deve ser aquecida até 37°C e reanalisada de seguida. O mesmo deve ser efectuado quando estamos perante uma aglutinação eritrocitária mediada por imunoglobulinas de classe IgM. Uma outra interferência resulta da presença de plaquetas macrocíticas em número elevado podendo aumentar a contagem de leucócitos. A leucemia pode provocar uma contagem muito baixa de eritrócitos devido ao aumento da fragilidade dos leucócitos, o que leva à destruição de algumas dessas células durante a contagem. Esses fragmentos também interferem com os parâmetros diferenciais dos leucócitos (Fig. 4). As drogas citotóxicas e imunossupressoras também podem ser uma das causas de aumento da fragilidade dos leucócitos.

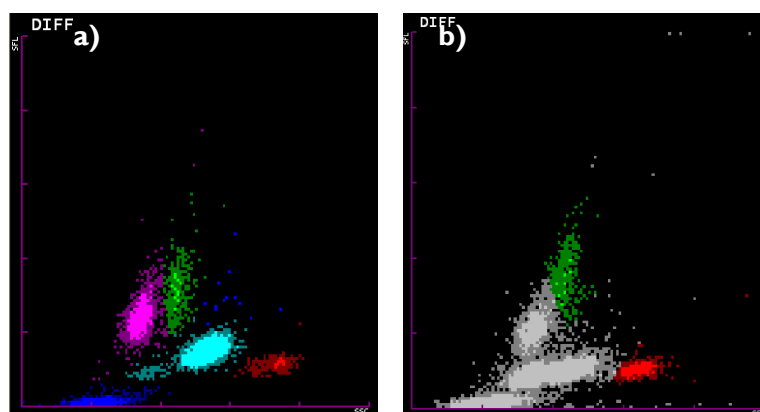


Figura 4 – Comparação de histograma leucocitário normal (a) e histograma apresentado erro de *scatter* devido a mieloplasia (b)

Os eritrócitos mal lisados provocam um resultado falsamente elevado de hemoglobina, mas que pode ser detectado através da observação de valores anormais na HGM e da CHGM e do aumento da linha de base na borda de referência do histograma dos eritrócitos. Uma contagem extremamente elevada de leucócitos causa uma dispersão excessiva de luz. Uma concentração elevada de lípidos na amostra de sangue confere uma aparência "leitosa" ao plasma. Outros

factores de interferência são as hiperproteinémias e hiperbilirrubinémias. A aglutinação de eritrócitos pode produzir valores inexactos de hematócritos e do volume glomerular médio. Os eritrócitos muito pequenos (micrócitos), os fragmentos de eritrócitos (esquizócitos) e fragmentos de leucócitos podem interferir na contagem adequada de plaquetas, provocando resultados elevados. Amostras hemolisadas podem aumentar as contagens de plaquetas, e o mesmo acontece com a presença de eritrócitos com inclusões.

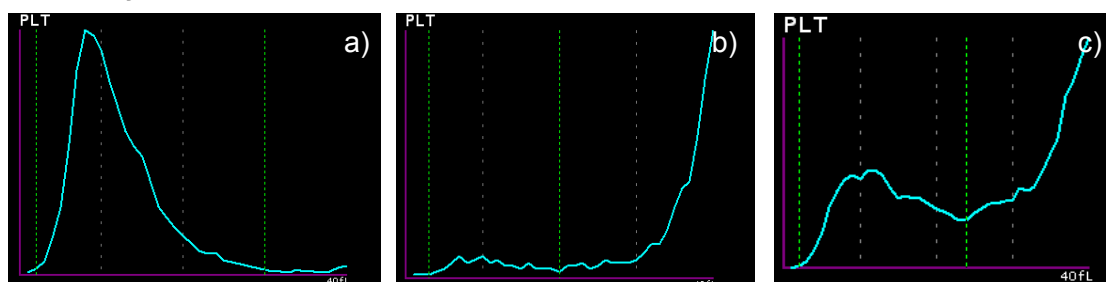


Figura 5
Histogramas plaquetários de três utentes: a) Contagem normal b) Trombocitopenia acentuada c) Aglutinação plaquetária originado falsa trombocitopenia

A presença de plaquetas gigantes leva a que estas não sejam contadas por excederem o limiar máximo do parâmetro correspondente. As plaquetas aglomeradas podem causar uma redução na contagem destas (Fig. 5). A amostra deve ser recolhida em anticoagulante de citrato de sódio para garantir o carácter anticoagulante e deve ser reanalisado apenas quanto à contagem de plaquetas. Todo o processo de interpretação de hemogramas e histogramas é assente num algoritmo pré-estabelecido (Fig. 6).

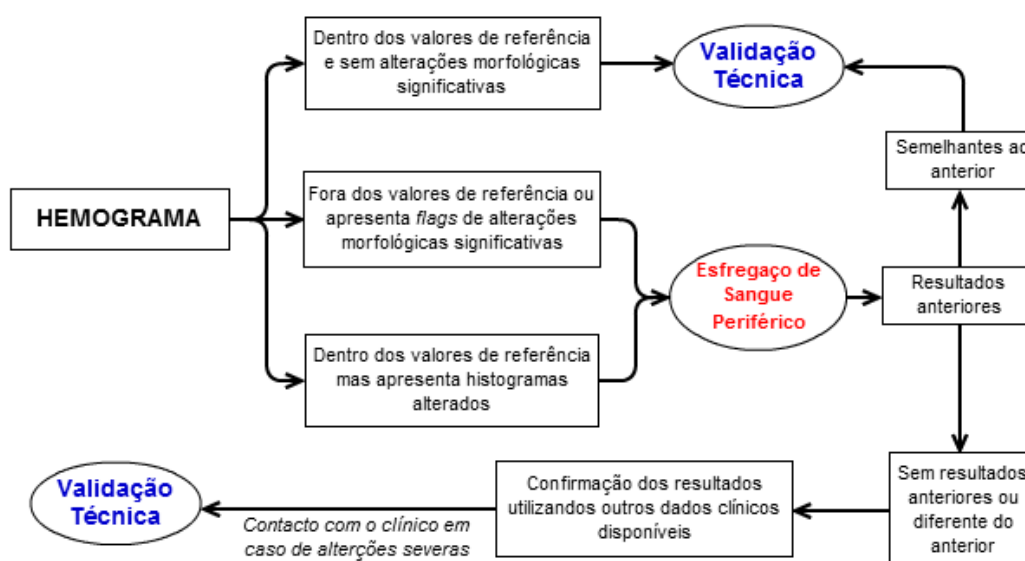


Figura 6
Representação esquemática do percurso de decisões na validação de hemogramas

15.5.1.4. Reticulócitos

Os reticulócitos são células anucleadas, no último estágio da eritropoiese, apresentando ainda no seu interior vestígios de grânulos de ribossomas, algumas mitocôndrias e ácidos nucleicos.

Os reticulócitos são contabilizados através de um método manual, com o auxílio de um contador celular. Expõem-se os eritrócitos durante 15 minutos a um corante específico para ácidos nucleicos (azul brilhante de *Cresil*), a 37°C; o corante fixa-se aos ácidos nucleicos ainda presentes nos eritrócitos. Observa-se ao microscópio óptico, utilizando uma objectiva de 100x e após contabilização de 1000 células da linhagem eritrocitária, avaliamos o número existente de eritrócitos com resíduos de ácidos nucleicos, o resultado é expresso em percentagem e representa a actividade eritropoiética medular em situação de libertação normal para a corrente sanguínea. (Hoffbrand, Moss, & Pettit, 2006)

15.5.1.5. Coloração de May-Grünwald-Giemsa

Esta coloração é útil para corar esfregaços realizados de sangue periférico, e realizam-se em três condições: a pedido do clínico, quando necessário seguindo o algoritmo acima descrito, ou para pesquisa e contagem de parasitemia (sendo que o método da gota espessa também é utilizado). Os esfregaços de sangue periférico podem ser preparados, no momento da colheita, a partir de sangue total sem anticoagulante ou a partir de sangue com anticoagulante (EDTA K₃). A coloração May-Grünwald-Giemsa é uma coloração do tipo *Romanowsky*. Os dois componentes principais são o Azur B (Trimetiltionina) e Eosina Y (Tetrabromofluoresceína). O Azur B liga-se a moléculas aniónicas, enquanto a Eosina Y liga-se aos sítios catiónicos proteicos. Assim, os ácidos nucleicos e proteínas têm afinidade para o corante básico – Azur B, enquanto que o grupo de moléculas da hemoglobina tem afinidade para os corante ácidos sendo corados pela Eosina. Relativamente às granulações leucocitárias temos: as neutrofílicas levemente coradas pelo Azur, as basofílicas coradas fortemente pelo Azur, e as eosinofílicas coradas pela Eosina (Fig. 7).

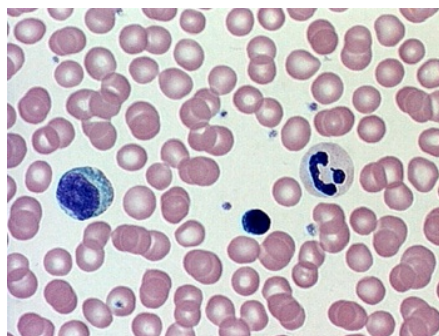


Figura 7 - Aspecto celular após coloração May-Grünwald-Giemsa

15.5.1.6. Coagulação

O Option 4 Plus® é o equipamento utilizado para o estudo da coagulação, tem como método a detecção do coágulo por alteração da densidade óptica do meio de reacção. Os testes da coagulação são executados em plasma com citrato numa razão de uma parte de citrato para nove de sangue.

A coagulação envolve as plaquetas e os factores de coagulação, os quais após a lesão são activados sequencialmente dando origem àquilo que chamamos a “cascata da coagulação”. A função principal é a selagem das zonas vasculares lesadas, com a formação de um *rolhão* plaquetário reforçado com fibrina e, finalmente, a retracção do coágulo. Os inibidores da coagulação, por sua vez, constituem um sistema de controlo ligando-se ao excesso de factores prevenindo a formação de trombos.

Os testes *in vitro* permitem distinguir 2 vias da cascata: via intrínseca e via extrínseca. Actualmente considera-se que *in vivo* ambas as vias são activadas e, portanto, a cascata deve ser considerada como um todo.

O Tempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) avalia a via intrínseca da cascata da coagulação pelo que testa a pré-caliceína, o cininogénio de alto peso molecular e os factores XII, XI, IX e VIII. Avalia também a via comum (factores X, V, II e I). Utiliza-se na detecção de deficiências congénitas e adquiridas destes factores e na monitorização terapêutica da heparina. (Hoffbrand, Moss, & Pettit, 2006) Neste teste utilizam-se substitutos de fosfolípidos plaquetários como a cefalina ou a inositina que são tromboplastinas parciais, incapazes de activar a via extrínseca. O plasma é colocado na presença de um destes fosfolípidos pró-coagulantes (cefalina neste caso), de um activador por contacto (*Kieselguhr*) e de cálcio. Regista-se, então, o tempo que o plasma leva a coagular. O APTT pode estar prolongado em situações como deficiência dos factores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, pré-caliceína e HMWK (Kininogen de alto peso molecular), doença hepática, coagulação intravascular disseminada (CID), terapêutica com heparina, anticoagulantes orais (doses altas) e trombolíticos. O APTT pode estar diminuído em qualquer estado de hipercoaguabilidade.

O Tempo de Protrombina (PT) avalia a via extrínseca da cascata da coagulação bem como a subsequente via comum. Reflecte alterações em três dos factores dependentes da vitamina K (factor II, VII e X), do fibrinogénio e do factor V. (Hoffbrand, Moss, & Pettit, 2006) É utilizado na monitorização dos anticoagulantes orais. Consiste na adição de tromboplastina com cálcio ao plasma citratado iniciando a cascata de reacções da qual resulta a formação de um coágulo de fibrina. O tempo decorrido entre a pipetagem do reagente e a formação de coágulo é medido.

Os resultados são referenciados como *International Normalized Ratio* (INR), razão entre o PT do paciente e o PT de referência elevado ao *International Sensitivity Index* (ISI) específico de referência.

O ISI reflecte as variações específicas de cada reagente, de acordo com as especificações de cada fabricante, mas pode ser alterado sempre que as nossas amostras biológicas reflectam variações tendenciais à média normalizada. (S., I.D., T.A., & F.E., 1994) Devido a alterações sistemáticas no fornecimento comercial deste reagente e, após ponderada a relação custo/benefício na aquisição de um novo equipamento, com todas as alterações processuais que daí adviriam, foi me proposto durante a realização do estágio nesta área a normalização do ISI. Utilizando uma *pool* de 40 amostras de pessoas saudáveis e sem histórico de problemas de hemostase, ajustou-se o ISI fornecido. Os tempos de protrombina de todas as amostras de plasma foram convertidos aos correspondentes valores logarítmicos. Uma regressão ortogonal foi então calculada e o valor do novo ISI retirado dessa regressão por ajuste do ISI fornecido.

Um INR prolongado pode traduzir deficiência dos factores I, II, V, VII, e X, deficiência de vitamina K, terapêutica com anticoagulantes cumarínicos ou com heparina em doses elevadas, doença hepática grave, síndrome nefrótica, CID. O INR pode estar diminuído em estados pró-trombóticos (como períodos pós-parto ou pós-cirúrgico). (Lewis, Bain, & Bates, 2001)

15.5.1.7. Técnicas Manuais em Imuno-Hematologia

Serão em seguida descritas as técnicas manuais utilizadas em imuno-hematologia, com uma breve descrição teórica, que foram realizadas durante o meu estágio.

Tipagem Sanguínea A, B, O:

A tipagem ABO é um dos parâmetros de maior importância dentro da imuno-hematologia, tendo implicações a nível de transfusões e de transplantação. Os antígenos ABO são expressos ao nível da membrana eritrocitária, endotelial e epitelial, desempenhando um papel muito importante como antígenos de histocompatibilidade. (Hoffbrand, Moss, & Pettit, 2006)

Existem 4 grupos sanguíneos: A, B, AB e O. Os epítomos antigénicos são determinados por hidratos de carbono ligados a polipéptidos ou lípidos, formando respectivamente glicoproteínas ou glicolípidos. A cada antígeno corresponde uma iso-aglutinina (Anti-A ou Anti-B), a qual está ausente num soro de um sujeito com o respectivo antígeno sobre as hemácias. Serologicamente, temos 2 subgrupos principais do Antígeno A: A1 e A2. A predominância é de A1 com cerca de 80% e os restantes pertencem ao grupo A2. Existem ainda outros subgrupos A, mas reflectem

mutações no gene A. Os reagentes usados para a grupagem sanguínea são anticorpos monoclonais IgM: Anti-A, Anti-B e Anti-AB. O método usado é a aglutinação directa com um reagente que indica a presença do antígeno correspondente.

Tipagem Rh:

Este sistema é muito complexo e, por essa razão, classifica-se os indivíduos como Rh positivo e Rh negativo, dependendo da presença ou ausência de antígeno D. Quando um indivíduo não possui antígenos do sistema Rh, o sistema imunitário é facilmente estimulado produzindo anticorpos quando na presença glóbulos vermelhos de antígeno positivo. (Hoffbrand, Moss, & Pettit, 2006) Estas situações podem ocorrer numa gravidez ou transfusão, podendo dar origem à doença hemolítica do recém-nascido ou a outras reacções hemolíticas graves.

Existem ainda indivíduos que têm uma expressão mais fraca do que o habitual do antígeno D, o que pode ser problemático a nível transfusional. A expressão D-fraco indica indivíduos com um número reduzido de antígeno D, enquanto D-parcial indica indivíduos com falta de epítomos D ou alterados. A técnica usada é igual à grupagem ABO, ou seja, aglutinação. O procedimento é o mesmo e é realizado ao mesmo tempo da grupagem ABO, sendo que a aglutinação corresponde a Rh positivo e a sua ausência é Rh negativo. A confirmação dos casos Rh negativos faz-se por técnica em tubo, utilizando um reagente com clones diferentes.

Coombs Directo e Indirecto:

O teste de Coombs é um dos principais testes serológicos imuno-hematológicos para detectar os anticorpos capazes de se unir ao seu antígeno homólogo eritrocitário sem desencadear a aglutinação das hemácias.

Os anticorpos *fixos* sobre as hemácias são detectados com ajuda de um soro com antiglobulinas humanas. Este reagirá com os anticorpos à superfície das hemácias sensibilizadas provocando a aglutinação entre elas.

O Coombs Directo tem como objectivo detectar os anticorpos incompletos fixos *in vivo* sobre as hemácias do sujeito. O Coombs Indirecto tem como objectivo a pesquisa no soro de anticorpos incompletos, incapazes de se ligarem sobre as hemácias susceptíveis de serem detectados pelo teste de coombs directo. O reagente usado permite reconhecer anticorpos do tipo IgG e do tipo IgM. Os anticorpos do tipo IgM que cobrem as hemácias fixam o complemento *in vivo* (e *in vitro* se a reacção se processar em presença de complemento). Este reagente detecta a presença de fracções de complemento à superfície da hemácia, pois

contem anti-C3d. A técnica baseia-se no princípio da hemaglutinação. (Hoffbrand, Moss, & Pettit, 2006)

15.5.1.8. Velocidade de Sedimentação

A velocidade de hemo-sedimentação (VS) é uma análise que consiste em avaliar a sedimentação dos eritrócitos permitindo verificar a existência de resposta inflamatória.



Figura 8 - **Ves-matic 30[®]**

O Ves-matic 30[®] (Fig. 8) é o equipamento que determina a velocidade de sedimentação, de acordo com o método Diesse – sistema automático. Este equipamento possui a capacidade de processar, simultaneamente, 30 amostras. (Menarini Diagnostics - Portugal) O método consiste em colocar sangue venoso num tubo com anticoagulante citrato de sódio 3,8% onde é medida a altura da camada de eritrócitos sedimentados num determinado período de tempo. A velocidade de sedimentação pode ainda ser determinada manualmente (método Westergren modificado), colocando sangue venoso anti coagulado numa pipeta graduada, esta é preenchida até à marca zero e deixada na posição vertical durante uma hora. A VS, expressa em mm/h, será a distância do sedimentado até ao topo da coluna inicial de eritrócitos (marca 0).

Os valores da VS podem ser influenciados por alguns erros analíticos como inclinação do tubo, temperatura ambiente elevada ($> 25^{\circ}\text{C}$), concentração de anticoagulante maior que a recomendada, medicamentos (heparina, contraceptivos orais), gravidez, que levam a um aumento da VS. Por outro lado, temperatura mais baixa que o recomendado ($< 20^{\circ}\text{C}$), atraso na realização do teste (deve ser feito até 2 horas após a colheita), medicamentos como anti-inflamatórios não esteróides em altas doses e corticosteróides diminuem a VS.

A VS é útil na monitorização de doenças como artrite temporal, polimialgia reumática, linfoma de Hodgkin e doenças inflamatórias crónicas como lúpus eritematoso e artrite reumatóide. Contudo, devido à baixa especificidade, este teste não deve ser usado isoladamente, sendo os critérios clínicos indispensáveis.

15.5.2. Bioquímica clínica

A secção de bioquímica clínica do laboratório A.C. R&S SA conta com um auto-analisador Cobas 6000 – Módulo C501[®], que apresenta uma solução integrada de métodos turbidimétricos, colorimétricos, imunoenzimáticos e um módulo ISE, que permite o doseamento do cloro, do potássio e do sódio. Neste capítulo irei ainda abordar a realização de proteinogramas electroforéticos e o procedimento para o doseamento da hemoglobina glicada.

15.5.2.1. Cobas 6000 – módulo c501[®]

O método imunoturbidimétrico utiliza anticorpos específicos para quantificação das proteínas séricas e tornou-se uma valiosa ferramenta de diagnóstico. As propriedades de dispersão da luz dos agregados de antigénio-anticorpo foram observadas pela primeira vez por Pope e Healey, em 1938. Ritchie utilizou leituras turbidimétricas para quantificar proteínas específicas. Lizana e Hellsing descreveram a intensificação da polimerização com polietilenoglicol (PEG) para melhorar a sensibilidade e aumentar a taxa de formação do complexo antigénio-anticorpo, permitindo a rápida progressão da reacção até ao fim e reduzindo o risco de falsos negativos em amostras que contenham antigénio em excesso. (Roche Diagnostics GmbH, 2005) Concentrações elevadas de antigénio podem originar o efeito de *hook*, do qual resultam falsas concentrações baixas.

O método colorimétrico utiliza a comparação da cor de uma amostra com a de um padrão, em circunstâncias adequadas, podemos saber a concentração de uma dada substância na amostra. (Hipólito-Reis, Nuno, & Alçada, 2002) A espectrofotometria consiste na medição da intensidade luminosa da luz a um comprimento de onda seleccionado, designando-se de espectrofotómetros os equipamentos que seleccionam o comprimento de onda desejado. Os testes colorimétricos baseiam-se na medição das variações de absorção na zona visível (entre 400 e 700 nm). (Burtis & Bruns, 2008)

O módulo ISE confere ao sistema um método electrónico, por potenciometria indirecta para determinações iónicas. A potenciometria é a medição da diferença de potencial entre dois eléctrodos numa célula electroquímica. Um eléctrodo consiste num condutor metálico em contacto com uma solução electrolítica. Os eléctrodos selectivos são sensores com capacidade para medir directamente fluidos biológicos. Os eléctrodos selectivos de iões medem sódio, potássio e cloro (amostra de soro). O potencial de cada eléctrodo é medido relativamente a um eléctrodo de voltagem estável fixa por cloreto de prata, o eléctrodo de referência. Um eléctrodo selectivo de ião desenvolve uma voltagem que varia com a concentração do ião ao qual

responde. (Roche Diagnostics GmbH, 2005) A relação entre a voltagem desenvolvida e a concentração do ião detectado é logarítmica, sendo expressa pela equação de *Nernst*.

Os métodos enzimáticos são mais rápidos, mais sensíveis e menos trabalhosos do que os métodos químicos. Os reagentes enzimáticos conservam-se bem quando liofilizados, no entanto, uma vez hidratados têm um período de utilização muito reduzido pois é difícil a sua conservação.

O método enzimático colorimétrico utiliza enzimas que tanto podem ser usadas como reagentes na determinação de um analito, ou serem elas próprias o analito a determinar. Tem sido crescente o uso de enzimas como reagentes analíticos, uma vez que oferecem a vantagem de maior especificidade para o substrato a ser determinado. (Hipólito-Reis, Nuno, & Alçada, 2002)

Os métodos enzimáticos na gama do UV avaliam as alterações na actividade ou concentrações de enzimas no soro que são predominantemente intracelulares e estão normalmente presentes em baixas concentrações. Pela detecção de alterações nos níveis destas enzimas durante situações patológicas, é possível inferir a localização e natureza da patologia. A quantidade de substrato transformado em produto durante uma reacção catalisada por uma enzima pode ser medida por um método analítico apropriado, como por exemplo alterações nas características de absorvância de um componente do sistema analítico. Serve de exemplo o caso das coenzimas NADH ou NADPH que podem ser monitorizados por alterações na absorvância a 340nm, durante a oxidação ou redução.

Na tabela V encontram-se enumerados, de acordo com o respectivo método, os testes bioquímicos que são elaborados no autoanalizador Cobas 6000 – Módulo C501® com uma breve descrição do seu valor no diagnóstico e na monitorização.

Tabela V – Determinações analíticas e respectiva definição efectuadas no Cobas 6000 – Módulo C501®.

Parâmetro	Definição
Imunoturbidimetria	
Albumina	A albumina tem como função principal manter a pressão osmótica nos espaços intra e extravascular. Níveis elevados ocorrem em desidratação aguda, enquanto a diminuição dos seus níveis ocorre em situações variadas como inflamação, doença hepática, perda urinária, perda gastrointestinal, ascite e edema. (Burtis & Bruns, 2008) O doseamento da microalbuminúria é importante na

	manutenção do dano renal em doentes diabéticos.
Transferrina	A avaliação dos níveis plasmáticos de transferrina é útil no diagnóstico diferencial da anemia e monitorização do tratamento da anemia ferropénica. (Burtis & Bruns, 2008)
Colorimetria	
Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total	A bilirrubina resulta do catabolismo do heme. O aumento de bilirrubina dá origem a icterícia, a qual pode ter diferentes causas como hemólise, doença hepatocelular, obstrução intra ou extrahepática, hereditárias e fisiológicas (neonatal). (Fauci & Braunwald, 2002)
Cálcio	Certas patologias podem estar associadas ao aumento ou diminuição nas concentrações de cálcio no sangue. Algumas causas comuns de hipocalcémia são a insuficiência renal crónica, hipoparatiroidismo, osteomalácia e hemorragia aguda. A hipercalcémia pode estar associada a doenças malignas, alterações da tiróide e hiperparatiroidismo. (Burtis & Bruns, 2008)
Creatinina	A creatinina é produzida a nível endógeno e é libertada a velocidade constante, sendo os níveis plasmáticos mantidos em limites estreitos. A sua clearance renal é um indicador de taxa de filtração glomerular. (Burtis & Bruns, 2008)
Proteínas Totais	As alterações mais comuns na concentração de proteínas, com relevância para o laboratório clínico, resultam da reacção de fase aguda, uma resposta inespecífica à inflamação ou dano tecidular. (Burtis & Bruns, 2008) A proteinúria permite averiguar a extensão do dano renal.
Ferro	A alteração do metabolismo do ferro está relacionada com várias outras patologias, incluindo anemia, doença cardiovascular, hepatite crónica, doença renal terminal e infecções. (Burtis & Bruns, 2008)
Magnésio	A deficiência de magnésio está associada ao desenvolvimento de hiperirritabilidade neuromuscular com tetania, indução da secreção de PTH e arritmia cardíaca. Por outro lado, a hipermagnesémia manifesta-se por depressão do sistema neuromuscular. (Burtis & Bruns, 2008) (McPherson & Pincus, 2006)
Enzimático Colorimétrico	
Amilase	A amilase é usada principalmente no despiste de doença pancreática. Além da pancreatite aguda, esta enzima pode encontrar-se elevada nas situações de ascite, peritonite, apendicite, doença neoplásica, colecistite e insuficiência renal. (Burtis & Bruns, 2008)
Ácido Úrico	O ácido úrico é o principal produto do metabolismo das purinas. A hiperuricemia pode estar associada a consumo excessivo de purinas na dieta, psoríase, insuficiência renal crónica e deficiência primária em enzimas do metabolismo. Este aumento pode ser responsável pela gota, o qual pode estar na origem de artrite e nefropatia. (Burtis & Bruns, 2008)
Colesterol Total	O colesterol é sintetizado de modo permanente em todo o organismo e é um componente essencial das membranas celulares e lipoproteínas. É igualmente, um precursor para a síntese de hormonas esteróides e ácidos biliares e de vitamina D. (Burtis & Bruns, 2008)
HDL	
LDL	

Fosfatase Alcalina	A determinação dos níveis séricos de fosfatase alcalina é de particular interesse na avaliação da doença hepatobiliar e doença óssea associada ao aumento da actividade osteoblástica. (Burtis & Bruns, 2008)
Gama-GT	A GGT tem origem no sistema hepatobiliar, estando a sua actividade elevada em todas as formas de doença hepática. O seu aumento é mais marcado, 5 a 30 vezes o valor normal, em casos de obstrução biliar intra-hepática ou pós-hepática. É a enzima hepática mais sensível na detecção de icterícia obstrutiva, colangite e colecistite. (Burtis & Bruns, 2008) (Laso, 2005)
Triglicéridos	Os triglicéridos constituem 95% do armazenamento de tecido gordo no organismo. Os quilomicrons contêm na sua composição 85% de triglicéridos. Todos os métodos de quantificação dos triglicéridos se baseiam na quantificação do glicerol. (Burtis & Bruns, 2008)
Fosfatase Ácida	A fosfatase ácida sérica é constituída por cinco isoenzimas produzidos pelos eritrócitos, plaquetas, células reticuloendoteliais do baço e fígado e células epiteliais dos rins, osso e próstata. A fosfatase ácida não prostática encontra-se aumentada nas situações de hipermetabolismo ósseo, nomeadamente, hiperparatireoidismo, doença de Paget e invasão maligna de tecido ósseo. A fracção prostática pode estar aumentada na existência de doença maligna da próstata. (Burtis & Bruns, 2008)
Fosfatase Ácida não prostática	
Enzimático UV	
ALT/GPT	As transaminases permitem a detecção de hepatites, mas apesar do aumento dos níveis séricos de AST e ALT nas situações de lesão da integridade do hepatócito, a ALT é uma enzima mais específica do fígado e a elevação das suas concentrações persistem por um período mais alargado do que a AST. (Burtis & Bruns, 2008) (Laso, 2005)
AST/GOT	
Creatinafosfoquinase	A actividade da CPK encontra-se elevada em diversas patologias do sistema músculo-esquelético, cardíaco, sistema nervoso central e tireóide. (Burtis & Bruns, 2008)
Glucose	A determinação da glucose permite o despiste de patologias associadas a hiper e hipoglicemia. A patologia mais pesquisada é a diabetes que constitui um grupo de desordens metabólicas dos hidratos de carbono no qual há intolerância à glucose originando hiperglicemia. (Burtis & Bruns, 2008)
Ureia	A ureia é o produto metabólico nitrogenado existente em maior quantidade no organismo, proveniente do catabolismo proteico. A principal utilidade clínica na determinação sérica da ureia baseia-se no cálculo da razão ureia pela creatinina usada na discriminação de uremia pós e pré-renal. (Burtis & Bruns, 2008)
Desidrogenase láctica	No laboratório clínico, a LDH é útil na avaliação de enfarte do miocárdio, miocardite, insuficiência cardíaca, hemólise, e doença renal. (Burtis & Bruns, 2008)
UV	
Fósforo	A determinação da fosfatemia permite detectar situações patológicas associadas a hipofosfatemia, como o hiperparatireoidismo, alcalose respiratória, aumento da secreção de insulina enquanto que a hiperfosfatemia, advém da insuficiência renal, hipoparatiroidismo, acidose respiratória, entre outras. (Burtis & Bruns, 2008) (McPherson & Pincus, 2006)

15.5.2.2. *Proteinograma Electroforético*

A electroforese é utilizada para detectar anomalias nas proteínas séricas. A variação em concentração e composição de proteínas pode alterar-se em condições fisiológicas e patológicas. A destruição celular e alterações no metabolismo são responsáveis por grandes alterações na concentração proteica sérica e/ou alterações nas fracções proteicas. (Burtis & Bruns, 2008) A electroforese em gel de agarose, executada a pH 8.9 no sistema semiautomático Interlab G26[®] apresenta como resultado final um proteinograma com 5 bandas: albumina e globulinas: α_1 , α_2 , β e γ .

15.5.2.3. *Hemoglobina glicada*

O doseamento da hemoglobina glicada é um parâmetro útil em doentes diabéticos permitindo-nos obter uma retrospectiva a longo prazo dos níveis de glucose no sangue. A formação de hemoglobina glicada é irreversível e o seu nível no sangue depende do tempo de vida do eritrócito (média de 120 dias) e da concentração de glucose no sangue. (Burtis & Bruns, 2008) A hemoglobina glicosilada é formada por condensação da glucose com a porção N-terminal da valina de cada cadeia da hemoglobina A, resultando numa base de Schiff instável. Posteriormente, sofre um rearranjo de *Amadori* formando a HbA_{1c}. (McPherson & Pincus, 2006)

Para a realização deste doseamento é usado um Adams Arkray-8160 que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência. Este tipo de cromatografia usa uma coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa. A leitura das fracções obtidas é realizada a 415 nm e 500 nm. Assim, nestes comprimentos de onda podemos obter as seguintes fracções: HbA_{1c}, HbA₁, HbF e hemoglobinas variantes. O tempo de eluição cromatográfico é de aproximadamente 4 minutos, após o qual se obtém o respectivo cromatograma. (Arkray Inc., 2010) No cromatograma, e consoante a migração das diferentes fracções, obtemos a respectiva razão para 100 % das percentagens correspondentes aos diferentes tipos de hemoglobina migrados.

15.5.2.4. *Análise química de urina e fezes*

A análise de urina envolve três princípios básicos: a avaliação visual da cor e aspecto da amostra de urina, a detecção de determinadas substâncias usando tiras teste, e o exame microscópico do sedimento urinário. A detecção de sangue oculto nas fezes é o principal exame bioquímico que se realiza nas fezes.

15.5.2.5. *Aution Max 4280*®

O Aution Max 4280® é um sistema totalmente automático de análise de urinas destinado à determinação qualitativa ou semi-quantitativa *in vitro* de analitos da urina, incluindo leucócitos, nitritos, proteínas, glicose, cetonas, urobilinogénios, bilirrubina e eritrócitos, assim como o pH, a densidade específica, a cor e o aspecto. As principais funções deste analisador incluem a identificação de amostras, distribuição automática de tiras teste, pipetagem automática de amostras e leituras fotométricas. A leitura da densidade específica é efectuada numa célula de fluxo que é preenchida com a amostra de urina. O pH é determinado por intermédio dos indicadores vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol. Os leucócitos são revelados pela presença das esterases granulocitárias, este é o parâmetro quantificado que apresenta uma maior desvio na rotina diária da realidade, como é posteriormente confirmado em análise do sedimento. O teste para detecção de proteínas baseia-se no princípio do erro proteico de um indicador de pH. O teste para nitritos é baseado na prova de *Griess*. A determinação da glucose é baseada na reacção específica da glucoseoxidase/peroxidase (método GOD/POD). O teste para os corpos cetónicos baseia-se no princípio da prova de Legal. Na determinação do urobilinogénio e bilirrubina, estes reagem com um sal de diazónio originando um corante azóico. A hemoglobina catalisa a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogénio orgânico contido na zona teste, originando uma coloração azul-esverdeada. Nos casos em que o volume de amostra é inferior a 2ml, a análise pelo equipamento não é possível, sendo então realizada a técnica manual em que uma tira teste é mergulhada na amostra e a leitura feita por comparação visual das cores obtidas com tabela respectiva. Em todas as solicitações de análise sumária de urina é efectuada uma análise ao sedimento urinário. O sedimento urinário é observado a microscópio óptico, após centrifugação de 10 mL de amostra e desprezando o sobrenadante, fazendo ressuspender o sedimento. Observa-se dez campos diferentes com a objectiva de 40 e regista-se a presença de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cilindros e cristais (com semi-quantificação) recorrendo-se a placas reticuladas comercializadas para o efeito.

15.5.2.6. *Sangue oculto nas fezes*

As causas mais comuns de sangue oculto nas fezes são a úlcera péptica, a gastrite erosiva, o carcinoma gástrico, o carcinoma e pólipos adenomatosos do cólon. O método utilizado é o método cromatográfico sem dieta, onde a membrana do teste cromatográfico encontra-se coberta com anticorpo anti-hemoglobina na região da linha teste. Durante o teste ocorre a reacção da mistura (fezes com solução eluente)

com a partícula coberta com anticorpo anti-hemoglobina humana. A mistura migra por cima da membrana por acção capilar para reagir com o anticorpo anti-hemoglobina, originando uma linha colorida. A presença da linha colorida indica um resulta positivo, enquanto a sua ausência indica um resultado negativo.

15.5.3. Imunologia e Endocrinologia

O laboratório de análises clínicas R&S SA conta com vários analisadores nesta secção de trabalho. A determinação dos parâmetros em determinado analisador encontra-se predefinida, bem como o fluxo de trabalho normal. As amostras encontram-se no tubo primário de colheita que é tanto comum a esta secção como à de bioquímica clínica.

Tabela VI – Determinações efectuadas na secção de Imunologia / Endocrinologia

	Vidas®	Cobas e601®	Elecsys 2010®	Cobas 6000-501®	Técnica Manual
Endocrinologia	LH, Progesterona, Testosterona, βHCG	Prolactina, FSH, 17-β-Estradiol	TSH, T3, T4, FT3, FT4	-	-
Imunoserologia	Ac. anti-HVC, Ac. anti-HBc, Ac. anti-HBs, Ac. anti-HVA, Ac. anti-CMV, Ac. anti-H. pylori; Ac. Anti-Toxoplasma; Ac. anti-Rubéola	Ac. anti-HIV I e II, Ag. Hbs		-	R. de Widal, Sífilis (RPR), Rosa Bengala
Auto-imunidade e imunoquímica	-	-	Anti-TG, anti-TPO, IgE	F, reumatóide, PCR, IgG, IgM, IgA, TASO	-
Marcadores Tumurais	CA 125, CA 15.3, α-fetoproteína	PSA Total, PSA Livre, CA 19.9, CEA	-	-	-
Marcadores de Anemia	Ferritina	-	Vitamina B12, Ácido Fólico	-	-

A utilização dos analisadores Vidas[®], Elecsys 2010[®] e Cobas e601[®] (Tab. VI) ocupou grande parte do meu estágio, pelo que contará com uma maior descrição nas páginas seguintes. Relativamente às técnicas manuais e aos procedimentos efectuado no Cobas 6000 – Módulo C501[®] apenas me irei referir aos mesmos de forma resumida e na sua globalidade.

15.5.3.1. Enzimo-fluorescência (ELFA) - VIDAS[®]

O sistema Vidas[®] utiliza o método imunoenzimático por sandwich com detecção final por fluorescência. A reacção decorre na fase sólida (cone); os determinantes antigénicos/anticorpos da amostra são capturados pelas imunoglobulinas monoclonais ou antigénios fixados no cone e, após lavagem dos componentes não fixados, o anticorpo marcado com fosfatase alcalina liga-se aos determinantes antigénicos. Uma segunda lavagem elimina o conjugado não fixado. Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é hidrolisado a 4-metil-umbeliferona, sendo a reacção catalisada pela enzima do conjugado. O produto final emite fluorescência proporcional à concentração dos determinantes antigénicos. O sistema Vidas[®] é um sistema multiparamétrico de imunoensaio com 5 secções diferentes, tendo cada uma 6 posições de testes, o que permite que diversos parâmetros sejam efectuados em simultâneo. As análises podem ser realizadas teste a teste ou em série. (bioMérieux SA, 2010)

O sistema Vidas[®] (Fig. 9) utiliza testes unitários prontos a usar. Os cones são o suporte de pipetagem e a fase sólida da reacção, estando sensibilizados com antigénio ou anticorpo. A barrete contém todos os reagentes necessários à reacção. Os reagentes unitários são de uso único, tendo a vantagem de ausência de contaminação. Tem capacidade para a realização de 60 testes por hora, sendo a identificação do doente feita manualmente, sem código de barras. Cada lote tem uma calibração que é memorizada pelo aparelho.



Figura 9
Sistema Vidas[®] - Biomérieux SA

No sistema Vidas® efectua-se as seguintes determinações:

alfa-fetoproteína (AFP)

A AFP é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado, saco vitelino e em menor quantidade pelo trato gastrointestinal do feto. Foi identificada como antigénio oncofetal. Durante a gravidez, a concentração de AFP no líquido amniótico atinge o máximo na 13ª semana e diminui rapidamente até à 22ª semana, diminuindo depois progressivamente. O título de AFP no soro materno ou líquido amniótico tem interesse na detecção de anomalias do fecho do tubo neural, anencefalia e espinha bífida. Em 70% dos casos de carcinomas hepatocelulares a AFP encontra-se elevada. É também um marcador de escolha para os tumores germinais não seminomatosos. (Parslow, 2001)

β-HCG

A biossíntese da hCG é assegurada principalmente pelo sinciotrofoblasto placentário. Durante os três primeiros meses de gravidez, a concentração sérica da hCG vai aumentar progressivamente até atingir um máximo, depois vai diminuir até à 16ª semana estabilizando até ao final da gravidez. O papel fisiológico da hCG é de manter o corpo amarelo, permitindo a sua transformação em corpo amarelo gestacional e de estimular a produção da progesterona e de estrogénios durante o primeiro trimestre da gravidez. Por outro lado, parece que a hCG intervém na diferenciação do tracto genital fetal. O doseamento da hCG é um elemento essencial do diagnóstico e do acompanhamento da gravidez (gravidez extra-uterina, embrião hidatiforme). É utilizada no rastreio pré-natal para rastreio de defeitos do tubo neural e síndrome de Down. A hCG pode também ser produzida por alguns tecidos tumorais, principalmente os de origem trofoblástica (coriocarcinoma). Neste âmbito, a hCG pode ser um marcador biológico de importante utilidade clínica, tanto para o prognóstico como para o acompanhamento terapêutico. (Parslow, 2001)

CA 15.3

O CA-15.3 é um marcador complementar no prognóstico e seguimento do tratamento de pacientes com tumores malignos diagnosticados. O valor do teste pode diminuir após tratamento e aumentar em caso de recaída, doença residual e metástases. Está mais associada a cancro da mama, e alguns cancros do pulmão. (Parslow, 2001)

CA 125

O CA125 está associado ao carcinoma do epitélio do ovário e a sua utilidade clínica aplica-se no “follow-up” de tumores uterinos. (Parslow, 2001)

Ferritina

A molécula de ferritina consiste num invólucro proteico e num núcleo de ferro. Encontram-se altas concentrações nas células do fígado e nos centros de reciclagem dos eritrócitos (células RE) no fígado, bÍlis e medula óssea. A ferritina existe nestes órgãos como fonte de reserva principal para fornecer ferro com função protectora contra o efeito tóxico do excesso e mantém uma reserva disponível para a eritropoiese. A ferritina também está presente no plasma onde a sua concentração é normalmente um indicador satisfatório do armazenamento de ferritina no organismo. (Parslow, 2001)

Testosterona

A testosterona é uma hormona que existe em maiores concentrações no homem que na mulher, e que circula no plasma 60% ligada fortemente (SHBG), cerca de 40% ligada à albumina e cerca de 2% na forma livre. A sua secreção é controlada no homem pela LH, que se liga os receptores das células de Leydig nos testículos, aumentando a conversão de colesterol em testosterona. Na mulher, a maioria da testosterona deriva do metabolismo da androstenediona, sendo secretadas pequenas quantidades directamente pelos ovários e glândulas suprarrenais. (Gardner & Shoback, 2007) O mecanismo de retroacção ao nível do hipotálamo e pituitária irá depender dos níveis de testosterona livre e seus metabolitos. A testosterona é utilizada no homem para avaliação da função das células de Leydig, monitorização da terapêutica de substituição com testosterona, etc. Pode também encontra-se aumentada nalguns tumores das células de Leydig e Sertoli, e em caso de resistência aos androgéneos. Nas mulheres, a deficiência em androgéneos não possui significado clínico, mas o seu excesso perturba o ciclo menstrual, conduz a hirsutismo e virilização. Os níveis de testosterona total poderão ainda aumentar ou diminuir sempre que existir um aumento ou diminuição dos níveis de SHBG, respectivamente.

Progesterona

Esta hormona é essencialmente uma hormona feminina. É produzida principalmente pelo corpo lúteo nas mulheres não grávidas e pelas glândulas suprarrenais nos homens e mulheres após menopausa. Durante a gravidez a placenta é a principal fonte desta hormona. Circula no soro ligada à globulina de ligação ao cortisol (18%), ligada à albumina (79%) e na forma livre (cerca de 3%). A sua importância fisiológica relaciona-se com as alterações cíclicas produzidas no endométrio necessárias à nidacão e desenvolvimento do embrião. (Gardner & Shoback, 2007) Ao nível do diagnóstico, a sua avaliação é utilizada para estudo da função luteínica (cujos defeitos poderão estar relacionados com infertilidade, menorragias, etc.),

verificação da eficiência da indução da ovulação (um valor elevado no 21º a 22º dia do ciclo menstrual é indicativo de ovulação), monitorização da terapêutica de substituição com progesterona, avaliação do risco de aborto espontâneo nas primeiras semanas de gravidez (encontra-se reduzida nestas situações), etc. Poderá encontrar-se aumentada na hiperprolactinemia e nos tumores das células de Leydig. Os seus níveis são normalmente baixos durante a fase folicular, aumentam significativamente após a ovulação e atingem o máximo 5 a 9 dias depois (21ª a 23ª dia). Após este pico, e se não houver gravidez, há um declínio dos níveis plasmáticos de progesterona.

LH

A LH é produzida de forma pulsátil pelas células gonadotróficas da hipófise anterior, sob o controlo do hipotálamo. Uma regulação negativa é assegurada pelas hormonas esteróides, cuja produção é estimulada pela LH. No homem, a LH exerce a sua acção nas células de Leydig do testículo, estimulando assim a produção de testosterona. Na mulher, em idade fértil, a LH em sinergia com a FSH intervém directamente no desenvolvimento dos folículos ovarianos aumentando a sua produção esteroidiana, e determina a ovulação. Na menopausa, a produção de estradiol diminui provocando o aumento da taxa sérica de LH. (Gardner & Shoback, 2007)

Citomegalovírus

O CMV, vírus pertencente à família *Herpesviridae*, encontra-se largamente distribuído na espécie humana. A sua transmissão ocorre por via vertical (durante a gestação, no trabalho de parto ou no aleitamento), ou por contacto com líquidos biológicos onde o vírus pode estar presente nomeadamente urina, saliva, sangue, sémen e fluidos vaginais. A transmissão pode ainda ocorrer em consequência de transfusões ou transplantes. Na maior parte dos casos a infecção pelo CMV está associada à ausência de sintomatologia ou a situações benignas, podendo nalguns casos ocorrer um síndrome mononucleósico com febre ou ainda hepatite. (Carter & Saunders, 2007) Após a infecção primária, o vírus fica latente podendo sofrer reactivações ao longo da vida do hospedeiro. No entanto, em certos grupos de risco, a infecção pelo CMV pode tornar-se extremamente preocupante. Exemplos destes grupos são os imunodeficientes e a mulher grávida, esta última pelo risco de transmissão de infecção para o feto. No laboratório, em situações de IgM positiva realiza-se o teste de avididade das IgG, por forma a datar e dar seguimento à primo-infecção.

Rúbeola

A rubéola é uma infecção viral de curta duração, geralmente discreta e benigna, quer no adulto quer na criança. Caracteriza-se por linfadenopatias, erupções maculopapulosas, febre e um mal-estar geral. A importância desta doença está relacionada com a sua capacidade de levar a malformações graves no feto cuja mãe foi infectada durante a gravidez, particularmente quando a primo-infecção se produz durante o primeiro trimestre. O vírus da rubéola transmite-se por gotículas de saliva ou pelas secreções nasofaríngeas. O indivíduo infectado é contagioso 8 dias antes a 8 dias após o início dos sinais clínicos. No período de incubação ocorre viremia e disseminação do vírus. (Carter & Saunders, 2007) A serologia para a rubéola utiliza-se para verificação da existência de imunidade após vacinação, avaliação da imunidade antes ou durante a gravidez e avaliação da existência de infecção aguda. Neste último caso, os anticorpos possuem um pico máximo 2 semanas após o aparecimento da erupção, sendo necessária a demonstração do aumento de título de IgG durante 3 semanas e aparecimento de anticorpos de classe IgM. Se não houver aumento de IgG, este facto não permite excluir totalmente uma infecção de rubéola activa. Só a avidez das IgG permitirá afirmar o diagnóstico da infecção da rubéola em curso e é efectuada em situações de positividade de IgM com recurso a laboratório externo subcontratado.

Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma parasitose provocada pelo parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, o qual possui como hospedeiro definitivo o gato. É uma afecção extremamente frequente e habitualmente benigna, com excepção da infecção primária na grávida (pelo risco de contaminação e lesão para o feto) e da infecção/reactivação nos imunodeprimidos. A infecção no homem pode ocorrer por via alimentar (quistos na carne mal cozinhada), via ambiental (oocistos libertados nas fezes dos gatos) ou transmissão vertical através da placenta lesada. (Parslow, 2001) Para além do diagnóstico, será importante na primo-infecção na grávida, determinar a data da contaminação para determinar o risco de contaminação fetal (a incidência de infecção fetal varia de acordo com a altura do período gestacional em que ocorreu a contaminação, sendo superior a partir da 29ª semana e inferior na fase pré-concepcional) e o prognóstico. Na infecção primária verifica-se o aparecimento de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgM, que desaparecem ao fim de 8 meses a 2 anos. A ausência prévia de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG e um aumento do seu título entre duas colheitas realizadas com um intervalo de cerca de 2 semanas são a favor de uma primoinfecção. No caso de suspeita de infecção, a serologia pode também ser utilizada no controlo do recém-nascido: existindo

infecção, após diminuição das IgGs maternas verificar-se-á um novo aumento, correspondendo agora às IgG produzidas pelo recém-nascido. Também nas situações de positividade de IgM se recorre à avidéz das IgG, recorrendo ao laboratório externo subcontratado.

Helicobacter pylori:

O *Helicobacter pylori* é considerado actualmente como o principal agente etiológico das doenças gastroduodenais. É um bacilo gram-negativo, de forma espiralada, responsável pelas gastrites e implicado na úlcera gastroduodenal e no cancro gástrico. (Garcia, 2007) A sua prevalência a nível da população portuguesa é bastante elevada, atingindo cerca de 80% de indivíduos em idade adulta. O diagnóstico laboratorial da infecção por *Helicobacter pylori* é complexo, podendo-se recorrer a métodos de diagnóstico directos e indirectos. Os métodos directos, como a cultura, o exame histológico e a detecção da actividade ureásica baseiam-se na detecção desta bactéria a partir de biopsias gástricas obtidas por endoscopia. Dentro dos métodos indirectos são largamente utilizados o teste respiratório com ureia marcada e a serologia. Recentemente foi desenvolvido um novo teste não invasivo, baseando-se na detecção de antigénios de *Helicobacter pylori* nas fezes.

Hepatite A

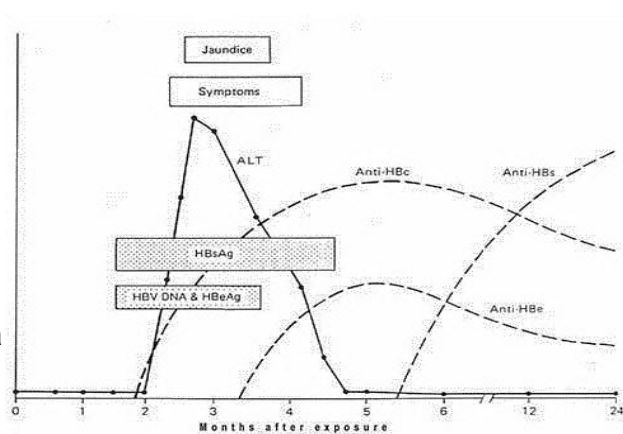
A hepatite A é causada pelo vírus da hepatite A (VHA), que possui genoma ARN da família *Picornaviridae*. A infecção manifesta-se clinicamente por uma patologia moderada anictérica ou hepatite severa com icterícia prolongada. Transmite-se predominantemente por via oral-fecal, sendo rara a sua transmissão sanguínea (viremia transitória), sexual (contactos anais) e por saliva (objectos contaminados). O seu período de incubação é de 28 dias, em média, ao fim do qual surgem a febre, fadiga, mialgia, anorexia, náuseas, vómitos, icterícia, urina escura e fezes pálidas. A duração da infecção é variável mas normalmente os indicadores clínicos e bioquímicos regridem ao fim de 4 a 8 semanas, podendo o indivíduo manter-se transmissor por um período de tempo superior. Não evolui para a cronicidade. Existem alguns casos de hepatite fulminante atribuídos ao VHA. A hepatite é provocada pela destruição do hepatócito por acção directa do sistema imunitário e não por acção do vírus sobre os hepatócitos infectados. (Carter & Saunders, 2007) O diagnóstico da infecção pelo VHA começa por ser clínico e bioquímico (aumento das transaminases e bilirrubina). No entanto, a confirmação da etiologia baseia-se essencialmente na determinação de anticorpos anti-VHA. A determinação do anticorpo anti-HVA IgM é o método de eleição para diagnóstico de uma infecção

aguda pelo VHA. O anticorpo anti-HVA IgG torna-se detectável durante a hepatite aguda e mantém-se positivo indefinidamente.

Hepatite B

O vírus da hepatite B pertence à família *Hepadnaviridae* e é transmitido por via parentérica, sexual e vertical. O período de incubação é tipicamente cerca de 100 dias (pode variar de 2 a 6 meses). As manifestações clínicas da hepatite B podem variar de assintomáticas a hepatite fulminante fatal. Pode evoluir para cronicidade e conduzir a uma situação de hepatite crónica que, por sua vez, pode conduzir a cirrose hepática e a carcinoma hepatocelular. O vírus da hepatite B contém vários antígenos que são importantes no diagnóstico: antígeno HBs (*surface*), HBc (*core*) e HBe. O último pode ser visto como um precursor do antígeno HBc. É encontrado livre no soro e é um marcador de infecciosidade. Todos os três antígenos induzem a formação dos anticorpos correspondentes. A hepatite B aguda pode ser diagnosticada imunologicamente. O marcador imunológico mais importante é o AgHBs que é detectável no soro durante o período de incubação, mesmo antes do aparecimento dos sintomas típicos. Na doença não complicada o AgHBs diminui continuamente e desaparece do soro em 5 a 6 semanas. É, assim, um marcador para a monitorização do processo de cura. Após o aparecimento do AgHBs, o AgHBe torna-se positivo. Só deve ser medido em doentes positivos para o AgHBs. Um AgHBe positivo indica uma elevada virémia e uma elevada infecciosidade. Contudo, na infecção com mutantes pré-core do VHB, o AgHBe permanece indetectável apesar de estar presente uma hepatite B grave. Dos anticorpos, o anti-HBc aparece precocemente no soro e permanece positivo durante anos. É detectável na hepatite B aguda e crónica, mesmo após resolução da infecção. O anti-HBe torna-se positivo após 3 a 4 meses durante a seroconversão (Fig. 10). Este teste é importante na avaliação do nível de viremia. A replicação viral é geralmente baixa se o anti-HBe está presente no soro. O último dos anticorpos é o anti-HBs, que se torna detectável após cerca de 6 meses, ou seja na fase de recuperação. A detecção do anti-HBs significa imunidade após doença ou imunização passiva. (Carter & Saunders, 2007)

Figura 10 - Percurso normal da produção de anticorpos após infecção com hepatite B



Hepatite C

A hepatite C é causada pelo vírus da hepatite C (VHC), pertencente à família *Flaviviridae* que apresenta no seu genoma uma cadeia simples de sentido positivo de ARN. A transmissão ocorre essencialmente por via parenteral (transfusões, hemodiálise, exposição ocupacional, utilização de seringas contaminadas). A transmissão perinatal e por via sexual são pouco frequentes. (Carter & Saunders, 2007) A infecção evolui para a cronicidade em cerca de 80% dos casos e é, na maioria dos casos, assintomática. A hepatite C crónica caracteriza-se por níveis flutuantes de alanina aminotransferase (ALT) e alterações da histologia hepática evoluindo para cirrose em 20% dos casos. O diagnóstico da hepatite C é efectuado por meio de técnicas serológicas directas e confirmado com técnicas de *Imunoblotting*.

No início do estágio, a pesquisa de anticorpos anti-VHC era realizada no equipamento Cobas e411[®], passando a fazer, posteriormente, parte do fluxo de trabalho do instrumento VIDAS[®]. Esse processo de transferência foi concluído após uma validação de método que ocorreu utilizando os dois equipamentos em simultâneo e recorrendo a amostras *difíceis* (índices de *cut-off* baixos e *imunoblot* indeterminado). Foram também tidas em conta outras variáveis importantes: o valor de preço por teste, as calibrações necessárias e as variações do controlo de qualidade interna e externa. Para validação do método foi ainda utilizado um terceiro laboratório subcontratado, onde as contra-análises eram realizadas. Foram também realizados testes imunocromatográficos disponíveis comercialmente, que não obtiveram validação técnica laboratorial devido a apresentarem uma grande percentagem de falsos negativos em amostras verdadeiramente positivas. Esse processo, da minha responsabilidade, teve a duração aproximada de um mês e permitiu-me um contacto mais próximo com os programas de avaliação externa de qualidade em vigor no laboratório abordados adiante.

Ige específica e Phadiotops

Muitas alergias são mediadas por imunoglobulinas específicas (IgE). Nos doentes sensibilizados que sofrem deste tipo de hipersensibilidade, as IgEs mediadas (atópica ou anafilática) funcionam como ponto de contacto entre o alergénio e células especializadas que libertam histaminas e outros agentes quando na presença desses alergénios, desencadeando-se uma reacção alérgica. Com base na história clínica, os testes *in vitro* de IgE específica podem auxiliar o clínico a identificar o alergénio (ou alergénios) para o qual o doente está sensibilizado. (Parslow, 2001)

15.5.3.2. *Electroquimioluminiscência - COBAS e601® & Elecsys 2010®*

Para os doseamentos efectuados nestes dois auto-analisadores (Fig. 11) de funcionamento análogo utiliza-se electroquimioluminiscência estando disponíveis testes com três princípios diferentes:

Competitivo

Para analitos de baixo peso molecular (exemplo: T3): Ao anticorpo anti-T3, ligado ao complexo de ruténio, são adicionadas micropartículas de estreptavidina e T3; os anticorpos ainda livres são ocupados e os complexos anticorpos-haptenos ligam-se às micropartículas; o reagente livre é removido; a quantidade de luz produzida é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra do paciente. (Roche Diagnostics Inc., 2006)

Sandwich

Para analitos de elevado peso molecular (exemplo: TSH): A amostra do paciente é combinada com o anticorpo anti-TSH biotinilado e um anticorpo específico para TSH ligado a ruténio; os anticorpos capturam a TSH presente na amostra. Num segundo passo, as micropartículas são adicionadas e o reagente livre é lavado; a quantidade de luz produzida é directamente proporcional à quantidade de TSH. (Roche Diagnostics Inc., 2006)

Bridging

Para detecção de anticorpos: Apresenta um princípio similar ao método sandwich, à excepção da detecção de anticorpos em vez de antígenos e as reacções decorrem em fase sólida com anticorpos monoclonais. (Roche Diagnostics Inc., 2006)



Figura 11 – Analisadores utilizados: Cobas e601® (esquerda) e Elecsys 2010® (direita)

FSH

A FSH é produzida de forma pulsátil pelas células gonadotróficas da hipófise anterior sob controlo do hipotálamo. É assegurado um retrocontrolo negativo principalmente pela inibina, cuja produção é estimulada pela FSH. No homem, a FSH exerce a sua acção em algumas células do tubo seminífero, as células de Sertoli. Na mulher em idade fértil, a FSH em sinergia com a LH intervém directamente no desenvolvimento dos folículos ovarianos aumentando a sua produção esteroideia, e determina a ovulação. Além disso, a FSH estimula algumas células foliculares (células da granulosa) levando à produção de inibina. No início da menopausa, a produção de inibina diminui e observa-se um aumento importante do nível sérico de FSH. O doseamento de FSH, associado ou não da LH, é um parâmetro essencial da exploração da função da reprodução. Tanto no homem como na mulher amenorreica, taxas elevadas demonstrarão um hipogonadismo primário e taxas baixas devem levar à pesquisa de um hipogonadismo secundário. (Gardner & Shoback, 2007)

Estradiol

O estradiol faz parte dos três estrogéneos cuja avaliação é utilizada na prática clínica. O estradiol corresponde ao estrogéneo mais abundante na mulher em idade fértil, sendo quase totalmente de origem ovárica; na grávida, o estrogéneo mais abundante é o estriol (metabolito da estrona e dos estradiol) e na pós-menopausa passa a ser a estrona (de origem ovárica e parte resultante da conversão periférica da androstenediona). No homem, a maioria do estradiol é produzido nos testículos. O estradiol encontra-se no plasma maioritariamente na forma conjugada: 60% ligado à albumina, 38% à globulina de ligação às hormonas sexuais (SHBG) e 2 a 3% na forma livre. O seu papel fisiológico relaciona-se com o desenvolvimento das características femininas secundárias, na mulher e no homem permite o desenvolvimento equilibrado dos espermatozóides. A sua avaliação pode ser utilizada para diagnosticar estádios hiperestrogénicos, como os tumores das células de Leydig nos testículos e tumores das células granulosa-tecais, para confirmação da menopausa, na avaliação da ovulação, e na avaliação das alterações do ciclo menstrual ou fertilidade. (Gardner & Shoback, 2007)

Prolactina

A prolactina é uma hormona produzida pelas células lactotróficas da pituitária. O controlo da sua secreção é essencialmente inibitório, pela dopamina, existindo no entanto alguns factores que induzem a sua secreção como a TRH. A sua secreção é pulsátil (daí que por vezes se recomende a determinação em amostras colhidas sequencialmente com intervalo de cerca de 30 minutos) e sofre variação circadiana,

com concentrações mais reduzidas ao meio-dia e mais elevadas durante o sono. A sua libertação é estimulada pela amamentação e por factores que induzem a inibição da dopamina, tais como fármacos antidopaminérgicos. O seu papel a nível fisiológico relaciona-se essencialmente com a indução e manutenção da lactação, podendo, quando em concentrações elevadas, inibir a actividade das gónadas, tanto no homem como na mulher. (Gardner & Shoback, 2007)

A determinação das concentrações de prolactina é especialmente útil na avaliação da hiperprolactinemia. Na mulher, a determinação da prolactinemia é utilizada sobretudo na avaliação da amenorreia primária e secundária, galactorreia, infertilidade, suspeita de prolactinomas e hirsutismo. No homem, o seu doseamento utiliza-se na avaliação da ginecomastia, hipospermia, oligospermia, impotência e também na suspeita de prolactinomas.

HIV I II + Ag p24 (IV Geração)

O vírus da imunodeficiência humana (VIH), o qual pode ser de dois tipos, VIH1 e VIH2, é o agente etiológico da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). É transmitido por contacto sexual, parenteral, perinatal, transplacentário. A infecção pelo VIH é uma infecção crónica, uma vez que o hospedeiro infectado é incapaz de eliminar o agente infeccioso. (Carter & Saunders, 2007) O percurso patogénico desta infecção passa por três fases: **fase primária**, caracterizada por uma elevada replicação viral e ausência de resposta imunológica por parte do hospedeiro; **fase assintomática**, caracterizada por cargas virais baixas devido à forte resposta imunológica do hospedeiro; **fase sintomática**: com aparecimento de infecções oportunistas devidas à diminuição da resposta imunológica, causada pela diminuição dos linfócitos T-CD4⁺. Os métodos de diagnóstico da infecção pelo VIH dividem-se em dois grupos: métodos directos, onde se põe em evidência a presença da partícula viral ou de componentes dessa partícula viral (isolamento viral, PCR, antígeno p24), e métodos indirectos, onde se põe em evidência a presença de anticorpos específicos para os antígenos virais (testes de rastreio e testes confirmatórios). A presença de anticorpos numa amostra é suficiente para concluir que se trata de alguém infectado pelo VIH. Isto apenas não se verifica no caso de crianças recém-nascidas (idade inferior a 18 meses) cujas mães sejam seropositivas para o VIH, uma vez que os anticorpos maternos (IgG) são transferidos passivamente através da placenta. A detecção combinada da antigenemia p24 e dos anticorpos anti-VIH1 e anti-VIH2 (ensaios de 4ª geração) reduz o tempo de detecção da infecção após exposição para cerca de 16 dias. (Roche Diagnostics Inc., 2010) Os testes de rastreio apresentam como características principais o facto de terem

sensibilidade de 100% (não deverão ocorrer falsos negativos) e uma especificidade pouco abaixo dos 100%. (Roche Diagnostics Inc., 2010) Esta última faz com que possam ocorrer resultados falsos positivos, daí que qualquer resultado positivo num teste de rastreio imponha a sua confirmação por testes com maior especificidade (*Western Blot*).

Endocrinologia Tiroideia

A TSH constitui o principal factor de estimulação da glândula da tiróide que determina a produção das hormonas T3 e T4. Em contrapartida, estas hormonas exercem um retrocontrolo na hipófise anterior que trava a secreção de TSH. A secreção da TSH está, além disso, sob o controlo do sistema nervoso central pelo intermédio da TRH e de neuromediadores como a somatostatina ou a dopamina. A medição da concentração de TSH é o parâmetro mais fiável para excluir uma disfunção tiroideia. No caso de hipertiroidismo, a concentração de TSH diminui fortemente. Nos casos de hipotiroidismo primário, a concentração da TSH é sempre nitidamente muito superior ao normal, acompanhada por uma diminuição das hormonas da tiróide. (Hall & Nieman, 2003)

A tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) são conjuntamente conhecidas como hormonas da tiróide. São sintetizadas na glândula tiróide pela iodinação e acoplamento de duas moléculas de tirosina enquanto ligadas a uma proteína complexa chamada tiroglobulina. A glândula tiróide secreta a maioria da T4 mas só cerca de 20% da triiodotironina (T3) é de origem tiroideia. Os tecidos periféricos, especialmente o fígado e rim, desionizam a T4 para produzir aproximadamente dois terços da T3 circulante. A maioria das células é capaz de captar a T4 e desionizá-la na forma biologicamente mais activa, T3. É a T3 que se liga aos receptores e desencadeia os efeitos nos órgãos alvo das hormonas da tiróide. As hormonas da tiróide são essenciais para a maturação normal e metabolismo de todos os tecidos no organismo, influenciando as taxas de síntese de proteínas e hidratos carbono.

No plasma, mais de 99,95% da T4 é transportada ligada a proteínas. A TBG transporta cerca de 70% da T4, a albumina aproximadamente 25% e a transtiretina (designada antigamente por pré-albumina) cerca de 5%. Mais de 99,5% da T3 é transportada pelas mesmas proteínas. É a concentração da forma não ligada, livre, da T3 e T4 que é importante para os efeitos biológicos das hormonas, incluindo o feedback da hipófise e hipotálamo. O hipertiroidismo é caracterizado pelo aumento da produção de hormonas da tiróide. O hipotiroidismo é caracterizado pela diminuição da produção de hormonas da tiróide.

Os anticorpos anti-tiroideos são encontrados em várias patologias da tiróide e outras doenças auto-imunes, dirigindo-se contra vários antígenos da glândula e das hormonas tiroideas. Estes incluem os anticorpos anti-tiroglobulina (anti-TG), anticorpos anti-peroxidase (anti-TPO), anticorpos contra os receptores da TSH, etc. Os anti-TG aparecem aumentados em indivíduos com tiroidite de Hashimoto (patologia autoimune que cursa com a destruição da glândula tiróide que se manifesta clinicamente sob a forma de hipotiroidismo); doença de Graves (forma de hipertiroidismo causado pelo aparecimento de anticorpos contra receptores da TSH) e outras patologias autoimunes, aparecendo também em muitos indivíduos eutiroideos. No entanto, níveis elevados de anticorpos anti-TPO surgem aumentados com mais frequência que estes. Como tal, a avaliação dos ATG torna-se mais útil na interpretação de resultados da determinação dos níveis de tiroglobulina visto que podem interferir com os imunoensaios utilizados para a sua determinação. (Hall & Nieman, 2003)

Marcadores Tumurais (TPSA, FPSA, CEA e CA 19.9)

O CEA é uma proteína oncofetal cuja presença no plasma em determinadas concentrações poderá estar associada à presença de tumores gastrointestinais, essencialmente do cólon. É, portanto, considerado um marcador tumoral, sendo recomendado como indicador de prognóstico, detecção de recorrências e monitorização de terapêutica no cancro do cólon, pela *American Society for Oncology*, não devendo ser utilizado como rastreio dada a elevada sobreposição de valores em estados malignos e não malignos. Níveis elevados de CEA são também encontrados noutras situações não malignas como algumas patologias hepáticas, lesões inflamatórias do tracto gastrointestinal, infecções, nos fumadores, etc. Sendo a sua metabolização hepática, lesões a este nível poderão conduzir a um aumento das concentrações séricas de CEA. (Parslow, 2001)

O PSA-Total é uma serina protease sintetizada pelas células epiteliais da glândula prostática, responsável pela liquefacção do sêmen de forma a promover a libertação e motilidade dos espermatozóides. Cerca de 5-40% do PSA-Total encontra-se na forma livre. A sua determinação é útil no rastreio, monitorização do tratamento e prognóstico de doentes com cancro da próstata. Ao contrário da maioria dos marcadores tumorais apresenta uma elevada especificidade para o tecido prostático, no entanto, não é exclusivamente indicador de malignidade, podendo encontrar-se elevado também na hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatite aguda e crónica, retenção urinária, massagem prostática, etc.. (Parslow, 2001)

A determinação do PSA-Livre aumenta a especificidade do PSA-Total na detecção do cancro da próstata, especialmente quando os valores de PSA-Total se encontram entre 4 e 10 ng/mL. A utilização da razão PSA-Livre/PSA-Total poderá reduzir o número de biopsias desnecessárias. Quanto mais baixa a percentagem de PSA-Livre, maior a probabilidade de cancro da próstata.

O CA19.9 encontra-se associado aos carcinomas gástricos e pancreáticos, sendo um bom indicador na eficácia do tratamento e na detecção de recidivas. (Parslow, 2001)

Ácido Fólico e Vitamina B12

O ácido fólico intervém em muitas reacções metabólicas como transportador de grupos carbono. A deficiência em ácido fólico pode ocorrer por má absorção intestinal, ingestão insuficiente, aumento das necessidades (gravidez, doença oncológica) ou por interferência de outros fármacos (metotrexato, por exemplo). A vitamina B12 está envolvida na maturação dos eritrócitos e no metabolismo geral das células somáticas. A deficiência em vitamina B12 pode estar associada à falta de factor intrínseco, pode ser secundária a patologias gastrointestinais (gastrectomia, inflamação, etc.). (Burtis & Bruns, 2008)

15.5.3.3. Cobas 6000 – Módulo c501®

Proteína C Reactiva

A PCR é uma glucoproteína que normalmente não se encontra presente no soro, sendo um indicador inespecífico de fase aguda. Esta proteína aparece em infecções e agressões com inflamação. O doseamento da PCR é utilizado para detectar processos inflamatórios sistémicos, avaliar o tratamento das infecções bacterianas com antibióticos, fazer a distinção entre a forma activa e inactiva de doenças com infecção concomitante, por exemplo, em doentes que sofrem de SLE ou colite ulcerosa, para controlar terapêuticamente as doenças reumáticas, avaliar a terapêutica anti-inflamatória e para distinguir entre infecção e rejeição de transplante da medula óssea. (Burtis & Bruns, 2008)

Factor Reumatóide

Os factores reumatóides são importantes para o diagnóstico da artrite reumatóide mas também podem ser encontrados noutras doenças reumáticas inflamatórias e em várias doenças não reumáticas: processos inflamatórios crónicos, doenças infecciosas como endocardite bacteriana subaguda, malária, sífilis, lepra, leishmaniose, tuberculose e doenças auto-imunes como o LES. Também são encontrados em pessoas saudáveis acima dos 60 anos sem especificidade.

Imunoglobulinas (iga, igm e igg)

A IgG é particularmente importante na defesa a longo prazo do organismo contra infecções, uma vez que, apresenta uma resposta mais lenta, mas mais sustentada do que a IgM a um estímulo antigénico primário. Contudo, os níveis de IgG sobem rapidamente se re-expostos ao mesmo estímulo antigénico. A IgG promove a fagocitose e activa o complemento. (Parslow, 2001)

A IgM tem como função principal na resposta imunitária a aglutinação de patogénios e a activação da via complementar clássica. (Parslow, 2001)

A IgA secretória é a imunoglobulina predominante nas secreções corporais, tais como a saliva, lágrimas, secreções nasais, muco traqueobrônquico e secreções gástricas. A função essencial desta IgA reside na ligação a microrganismos nas mucosas, a activação da via alternativa do complemento e a activação de reacções inflamatórias. (Parslow, 2001)

TASO (título de anti-estreptolisina o)

As infecções por *estreptococos* do grupo A são uma das causas mais comuns de infecções bacterianas humanas, provocando doenças como a febre reumática aguda, glomerulonefrite aguda, faringite aguda, sinusite, pneumonia, escarlatina, gangrena e linfangite. A estreptolisina O é uma hemolisina produzida pelos estreptococos do grupo A. Num indivíduo infectado, a estreptolisina O age como um antígeno proteico ao qual o doente cria uma resposta imunitária mediada por anticorpos. Os níveis aumentam numa semana e têm o seu pico 3-6 semanas após infecção. Na ausência de complicações ou reincidência da infecção, geralmente o nível de TASO cairá para níveis de pré-infecção dentro de 6-12 meses.

15.5.3.4. Técnicas Manuais

Rosa Bengala:

A brucelose é uma zoonose transmitida aos seres humanos por animais infectados. Pode ser causada por qualquer uma das 4 espécies de *Brucella*: *Brucella melitensis* (a mais comum e mais virulenta) adquirida a partir de: cabras, ovelhas e camelos; *Brucella abortus*, existente no gado ovino; *B. suis* nos suínos; e *B. canis* nos cães. O serodiagnóstico clássico das infecções agudas por *Brucella* baseia-se na pesquisa e titulação dos anticorpos da classe M (aglutinantes) e IgG anti-antígenos polissacarídicos A e M da parede celular, utilizando as reacções imunológicas de aglutinação directa de *Huddleson* (método em lâmina), de Rosa de bengala (método em lâmina) e de *Wright* (método em tubo).

Reacção de Widal

As salmoneloses são infecções provocadas por microorganismos gram-negativos da família das enterobactérias, as *Salmonelas*. A serotipagem baseia-se na reactividade imunológica dos antígenos somáticos, “O”, que são predominantemente lipopolissacáridos, e dos antígenos capsulares, “H”.

As manifestações clínicas e gravidade da infecção por microorganismos do género *Salmonella* irão depender do serotipo envolvido. Estas podem distinguir-se clinicamente em salmoneloses “não tifóides” e “tifóides”. O serotipo *Salmonella typhi* é o responsável pela febre tifóide. Este serotipo tem o homem como único reservatório e pode existir em portadores saudáveis. Os serotipos *paratyphi* A, B e C, provocam uma síndrome semelhante à febre tifóide. O único teste laboratorial específico para o diagnóstico da salmonelose é o seu isolamento em cultura. Existem no entanto métodos de serodiagnóstico que, apesar da sua reduzida inespecificidade e sensibilidade, continuam a ser muito solicitados, tais como a reacção de Widal.

Sífilis (RPR)

A sífilis é uma infecção crónica causada por uma espiroqueta, o *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. É habitualmente transmitida por via sexual (mas também de transmissão congénita) e caracteriza-se por episódios de doença activa interrompidos por períodos de latência. Após um período médio de incubação de 2 a 6 semanas, aparece uma lesão primária frequentemente associada a linfadenopatia regional (sífilis primária). Um estadio bacteriémico secundário, associado a lesões cutâneo-mucosas generalizadas (sífilis secundária) é seguido por um período latente de infecção subclínica que pode durar muitos anos (sífilis latente). Em cerca de 1/3 dos casos não tratados segue-se um estágio terciário, caracterizado por lesões cutâneo-mucosas, músculo-esqueléticas e parenquimatosas, progressivamente destrutivas, aortite ou patologia sintomática do sistema nervoso central (sífilis terciária). O *T. pallidum* é um microorganismo fastidioso, não cultivável em meios de cultura habituais, sendo a sua presença normalmente demonstrada de forma indirecta por testes serológicos. Os anticorpos desenvolvidos em resposta a um contacto do organismo com o *T. pallidum* classificam-se como não treponémicos e treponémicos. Os anticorpos não treponemais aparecem entre 1 e 4 semanas após a infecção e permanecem elevados até que se inicie a terapêutica antimicrobiana ou quando o paciente entra na fase tardia da infecção. Uma vez iniciada a terapia antimicrobiana eficaz, os títulos dos anticorpos não treponemais começam a declinar, frequentemente atingindo níveis não detectáveis antes do final do tratamento. Tem-se verificado nos

últimos anos um aumento no caso de RPR's positivas, que são confirmadas em laboratório externo pelo doseamento de anticorpos anti-*T. pallidum* totais.

15.5.4. Microbiologia

Embora a área da microbiologia seja uma área bastante abrangente, e tendo o Laboratório R&S S.A., valências para operar em todas as áreas desta, apresenta normalmente um fluxo de trabalho específico e muito restrito, efectuando principalmente exames microbiológicos de urina (aproximadamente 80%), coproculturas, análise bacteriológica a exsudados e exames micológicos.

15.5.4.1. Sistema Vitek 2 Compact®

Actualmente a área da microbiologia conta com os métodos automáticos mais avançados de identificação e susceptibilidade a antibióticos, os sistemas Vitek 2® e Vitek 2 Compact® da BioMérieux SA utilizam a mesma tecnologia para identificação de microorganismos e para o teste de susceptibilidade de antibióticos e por essa razão são apresentados em conjunto.

Este sistema possui uma unidade de leitura de códigos de barras das cartas de identificação e antibiogramas; o aparelho inclui: uma câmara de enchimento de cartas por vácuo, uma zona de selagem das cartas e uma zona de incubação e leitura automática de cartas (por turbidimetria e colorimetria) e um potente *software* e base de dados que analisa e interpreta os dados enviados pelo sistema de leitura do aparelho. Este *software* inclui o chamado *AES (Advanced Expert System)*, o qual cruza a informação da identificação e do antibiograma. Esta informação permite a avaliação dos valores de CMI e a identificação de alguns fenótipos de acordo com os resultados obtidos. Esta avaliação final indica se o resultado do antibiograma é consistente com a bactéria identificada. (bioMérieux SA, 2005)

Cartas de identificação: Cada carta possui poços que contêm substratos bioquímicos desidratados. Não são necessários reagentes adicionais, pelo que se elimina deste modo o risco de omissão ou de erro.

Cartas de antibiograma: A carta teste de susceptibilidade aos antibióticos contém poços contendo os substratos de antibióticos.

Deste modo, a maioria dos microorganismos são identificados e em seguida são feitos os seus antibiogramas por este sistema, permitindo uma maior segurança nos resultados obtidos. Uma vez que as cartas são seladas, a possibilidade de contaminação é menor. Por esta razão, as contaminações colocam-se muitas vezes do lado do utilizador no momento da manipulação das caixas ao fazer as suspensões que encherão as cartas.

O procedimento para a realização dos testes de identificação dos microorganismos isolados e dos seus testes de sensibilidade aos antibióticos, através do sistema Vitek 2 Compact®, é executado segundo as indicações do fornecedor.

15.5.4.2. *Processamento Laboratorial*

Em seguida descrevem-se resumidamente as principais observações a reter para cada diferente análise bacteriológica, destacando as mais efectuadas no laboratório.

Coproculturas

As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, com grande morbilidade em alguns grupos de etários, como é o caso das crianças e idosos. Os antecedentes epidemiológicos, a existência de factores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia devem orientar na pesquisa do agente etiológico. As enterocolites agudas são infecções do intestino delgado ou do cólon devidas a bactérias entero-invasivas, bactérias toxinogénicas não invasivas e a exotoxinas bacterianas produzidas nos alimentos. As bactérias com características invasivas, capazes de destruir a mucosa, aderem às células epiteliais, penetram e multiplicam-se, originando a síndrome desintérico com ulcerações características, que dão origem a fezes múltiplas com sangue e pus (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*). (Garcia, 2007) As bactérias produtoras de exotoxinas ou enterotoxinas fixam-se à superfície da mucosa, mas não penetram no epitélio e produzem uma exotoxina. Verifica-se um fluxo de líquidos através da parede celular com aumento de secreção dos sucos digestivos (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Bacillus cereus* produtor de enterotoxina termolábil, *Campylobacter jejuni*).

No laboratório R&S S.A., as coproculturas são direccionadas principalmente para área geográfica onde este está inserido, privilegiando a pesquisa de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7 e *Cryptosporidium parvum*. O procedimento é efectuado segundo fluxograma abaixo descrito (Fig. 12).

Após isolamento bacteriano, a sua respectiva identificação e antibiograma é realizado recorrendo ao sistema Vitek 2®. Na área geográfica onde o estágio foi desenvolvido observou-se um grande número de coproculturas positivas devido à presença de oocistos de *Cryptosporidium parvum*.

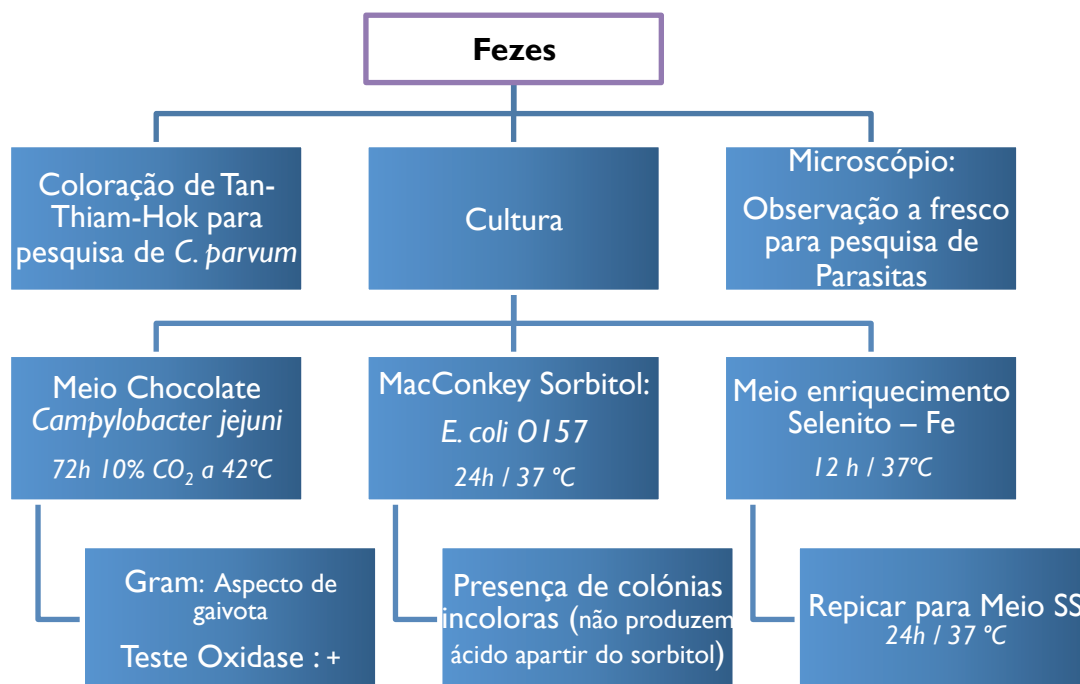


Figura 12 - Fluxograma seguido na realização de coproculturas no Laboratório R&S S.A

Espermocultura

A espermocultura serve de auxiliar de diagnóstico nas infeções do trato genital masculino. Os microrganismos mais frequentemente valorizados são *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacteriaceae*. (Garcia, 2007) Deve realizar-se o exame a fresco e pesquisar ao microscópio óptico a presença células, leucócitos, eritrócitos, formas leveduriformes e filamentosas de fungos.

Exame Micológico

A inoculação de amostras em Sabouraud é já parte integrante de exames culturais das seguintes amostras: exsudado vaginal, exsudado uretral, espermocultura, exsudado purulento, exsudado auricular e exsudado ocular. Das amostras dos restantes produtos só é realizado exame micológico quando especificamente prescrito pelo médico.

O exame micológico baseia-se principalmente na sementeira em meio Sabouraud com clorafenicol e gentamicina, a 37°C durante 48 horas; caso se verifique a presença de colónias suspeitas deve procede-se ao exame a fresco, a prova da filamentação pode ser útil nos casos de identificação de espécies micológicas do género *Candida spp*.

Para a pesquisa de fungos filamentosos colocar o meio Sabouraud com clorafenicol e gentamicina a 25°C durante pelo menos uma semana, observando o crescimento a cada 24 horas. Se se verificar o crescimento de fungo filamentoso a sua identificação é feita com base nas suas estruturas morfológicas características.

Expectoração

Nas vias aéreas inferiores, as infecções pulmonares crónicas podem resultar de numerosas bactérias no parênquima pulmonar. Manifestam-se por sinais pulmonares discretos e variáveis consoante o agente infeccioso (por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*). A pleurisia resulta de infecções da cavidade pleural acompanhada de um exsudado inflamatório, as quais podem ser devidas a *Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*. (Garcia, 2007) O diagnóstico das infecções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório deve processar apenas amostras de boa qualidade. Uma amostra de boa qualidade é definida pelo exame directo. Proceder à coloração de Gram num dos esfregaços e no outro à coloração de Ziehl-Neelsen, se pedida a pesquisa de micobactérias, nomeadamente Bacilo de Koch (B.K.).

Exsudado Auricular / Ocular

A otite média é uma infecção muito frequente em bebés e crianças, sendo os agentes mais frequentes *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *H. Influenzae*. (Garcia, 2007) As infecções oculares incluem infecções das estruturas externas do olho (blefarites, conjuntivites e queratites), das estruturas internas do olho (endoftalmites) e infecções do sistema lacrimal (canaliculites, dacriocistites, dacrioadenites). A nível do saco conjuntival existe uma flora saprófita constituída principalmente por *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Corynebacterium spp* e *Propionibacterium acnes*.

Exsudado Orofaringeo

As infecções das vias respiratórias superiores são muito frequentes, sendo a maior parte de etiologia viral. O diagnóstico bacteriológico dessas situações representa uma tentativa de identificar, entre uma flora endógena abundante, o(s) agente(s) implicado(s) na infecção. Vários agentes patogénicos tais como o *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenza*, *N. meningitidis*, leveduras e membros das *Enterobacteriaceae*, podem constituir uma flora transitória ou estar presente em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis. (Garcia, 2007)

A principal causa de faringite é viral. Na faringite bacteriana o principal agente causal é o *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A. Outras causas de faringite são a

Neisseria gonorrhoeae, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, devendo a pesquisa destes agentes ser feita exclusivamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do médico. Assim, por rotina só será investigada a presença de *Streptococcus* β -hemolíticos dos grupos A, C e G de Lancefield. A possível investigação de outros agentes no laboratório R&S S.A. só é feita por prescrição orientada.

Exsudado Vaginal/Uretal

A determinação de amostras apropriadas para o diagnóstico de infecções do aparelho genital depende do local de infecção e dos microrganismos. Algumas infecções do aparelho genital feminino são devidas a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é activada por factores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita. (Garcia, 2007)

Nas cervicites: infecções do epitélio do endocolo marcadas por uma leucorreia purulenta, os principais microrganismos associados são *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. As uretrites são infecções da uretra com sintomatologia mais marcada no homem que na mulher, as quais podem apresentar infecções assintomáticas (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*). As vaginites e bartolinites, infecções do epitélio vaginal e das glândulas de Bartholin, estão associadas à flora comensal (*Gardnerella vaginalis*). Habitualmente pesquisa-se a presença de fungos (nomeadamente *Candida* spp), parasitas (*Trichomonas vaginalis*) e bactérias (*Gardnerella vaginalis*). A possível pesquisa de outros agentes, nomeadamente *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo B de Lancefield (*Streptococcus agalactiae*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, só serão efectuadas mediante prescrição orientada. Em grávidas, fazer sempre sementeira em gelose de sangue para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*. Em crianças, mulheres no pós-parto e sempre que seja prescrito pelo médico fazer sementeira em gelose de sangue para pesquisa de *Streptococcus* grupo B.

Urina

As infecções do aparelho urinário são uma das infecções mais frequentes no Homem. A infecção urinária aguda é geralmente causada por bactérias da flora intestinal saprófita que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra, após contaminação através da flora fecal e perineal. No entanto, a via de contaminação também poderá ser descendente ou hematogénea (secundária a uma septicemia), iatrogénea (flora comensal) ou exógenas (introduzidas por cateter ou sondas vesicais). Os agentes etiológicos mais frequentes nas crianças e adultos são

as *Enterobacteriaceae* com grande destaque para a *Escherichia coli*. Em doentes com factores de risco como algália permanente, cálculos urinários e outras patologias do aparelho urinário, o leque de agentes etiológicos alarga-se a outros microrganismos, como *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp* e fungos. (Garcia, 2007)

O procedimento para a realização de uroculturas descreve-se na tabela VII.

Tabela VII - **Procedimento a observar na realização de uma urocultura**

1 °	Semear com ansa calibrada de 10 µl o meio de CPS Id3.
2 °	Incubar em aerobiose, em estufa a 37°C durante 18 a 24h.
3 °	Após executada a sementeira, retirar uma parte de urina para um tubo de ensaio e centrifugar a 1500 rotações / minuto, durante 5 a 10 minutos.
4 °	Rejeitar o sobrenadante e colocar uma gota de sedimento para observação a fresco.

A avaliação do sedimento urinário a fresco reveste-se de extrema importância na abordagem inicial ao pedido de um exame cultural à urina, a quantificação de elementos presentes pode ser estratificado e uma primeira interpretação pode ser realizada.

15.5.4.3. Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA)

O TSA deve ser efectuado em situações específicas: para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, para estudos epidemiológicos de resistência e em estudos de novos agentes antimicrobianos, em todos os microrganismos isolados de locais geralmente estéreis, nas situações clínicas que requerem terapêuticas prolongadas, na ausência de resposta à terapêutica empírica instituída.

No laboratório R&S S.A., o antibiograma respectivo é efectuado por métodos instrumentais recorrendo ao Vitek 2®, embora em situações especiais recorra-se aos métodos clássicos como o de difusão em disco – Método de Kirby Bauer.

15.5.4.4. Exame Parasitológico de Fezes

As fezes devem ser recolhidas, e entregues rapidamente no laboratório. Deve repetir-se a colheita de amostras duas a três vezes para evitar um período negativo e quando possível é necessário recolher informações relativas ao paciente para melhor avaliar as técnicas a escolher: viagens, sintomas, eosinofilia, tratamentos prescritos.

Após recolha, a amostra deve ser avaliada quanto a: aspecto das fezes, consistência e cor, aspecto macroscópico para pesquisa de vermes adultos (para pesquisa de oxiúros, ténias, ascaris), deve efectuar-se um exame microscópico directo (para observar o aspecto sumário da digestão, a presença de formas vegetativas de amibas e flagelados) e um exame microscópico após concentração (procurando essencialmente ovos, quistos e larvas). O método utilizado durante o estágio no exame parasitológico com concentração é o método de Ritchie modificado, disponível comercialmente e que utiliza a mesma base técnica do original (com centrifugação, formol e lugol) mas que torna todo o processo mais cómodo e resolutivo, originando o mesmo grau de eficácia do primeiro.

A microbiologia, a parasitologia e a micologia são, como já referido, áreas bastante abrangentes, devendo utilizar-se resultados de outras áreas laboratoriais (nomeadamente resultados imunológicos) sempre que possível para avaliar resultados e fornecer respostas mais concretas e correctas possíveis.

15.6. Fase Pós - Analítica

15.6.1. Controle de Qualidade

O Controlo de Qualidade Interno é o conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo de qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas. Tem como objectivo garantir a detecção de anomalias, avaliação de erros e sua imediata correcção. (Frade, 2005)

CQI

O controlo de qualidade interno é efectuado tendo em conta os critérios definidos para cada analisador e para cada procedimento.

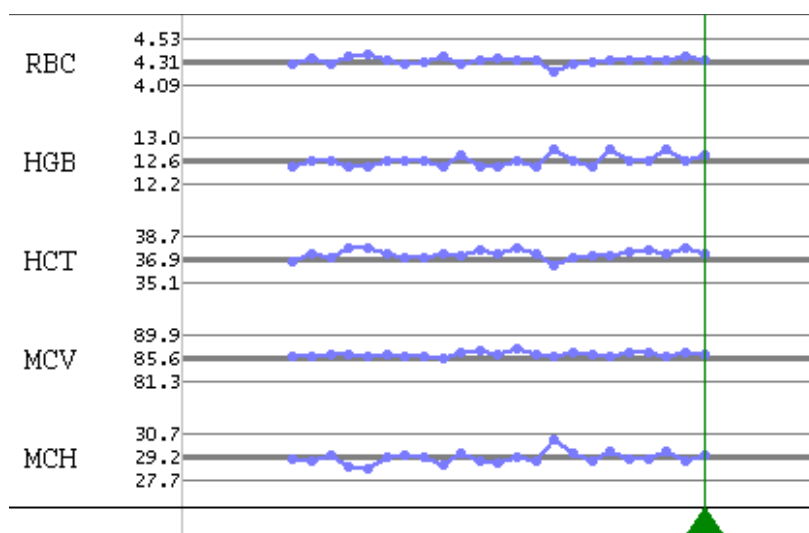


Figura 13 - Carta de controlo interno para alguns parâmetros do hemograma

Devido à heterogeneidade de técnicas analíticas existentes, e de forma a harmonizar o controlo de qualidade interno no laboratório R&S S.A., foram definidas directrizes gerais, que são especificamente adaptadas a cada processo. De um modo geral temos:

- Utilização de controlos universais de dois níveis diferentes (normal e patológico) no início de cada dia de trabalho
- Repetição de amostras de utentes no mesmo dia retiradas aleatoriamente e executados em diferentes fases do dia de trabalho
- O CQI em técnicas serológicas, imunológicas e de endocrinológicas é realizado aquando da abertura de novos lotes, duas vezes por semana, intercalando entre os níveis patológicos e normal e sempre que se justifique (Fig. 13).

No que toca ao controlo de qualidade interno, tive oportunidade de elaborar cartas de controlo, (Fig. 14) utilizando para isso os valores diários observados do CQI e ainda a utilização de amostras cegas previamente doseadas. O laboratório tem especificações de qualidade analítica definidas para a maior parte dos parâmetros analíticos utilizando critérios onde a imprecisão utilizada é menor que aquela observada seguindo os valores da variação biológica.

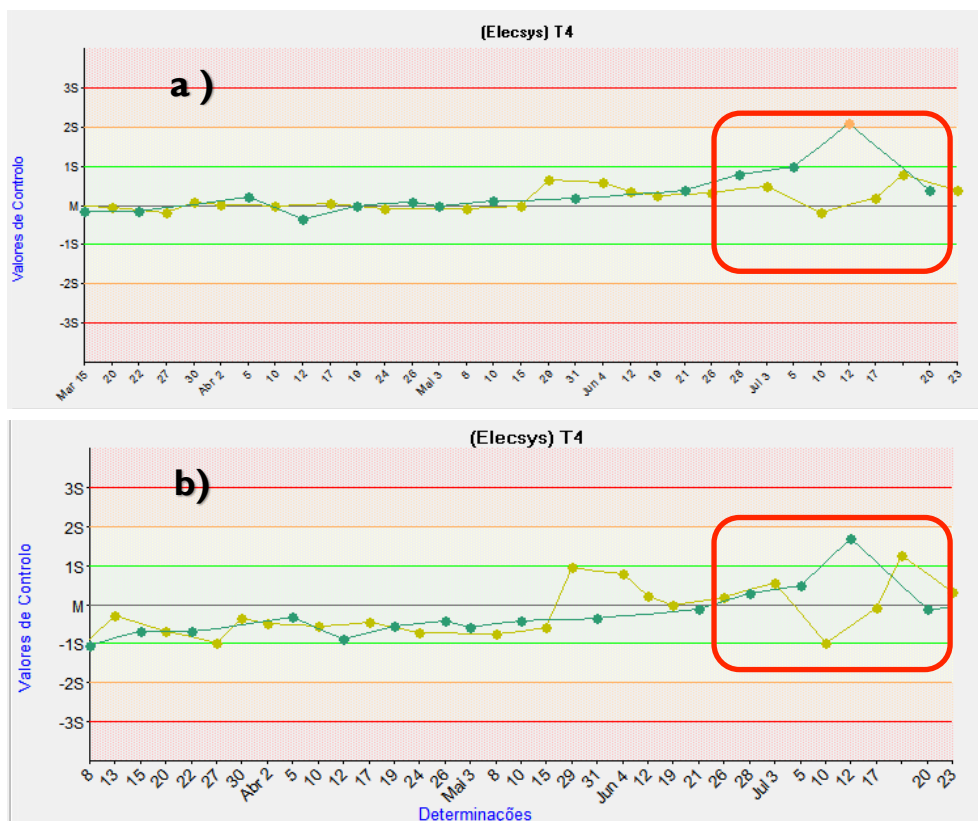


Figura 14- Carta de controlo interno para o doseamento da T4
Podem observar-se as alterações na zona destacada após ajuste da carta de controlo para este método.

- a) Intervalos com valores fornecidos pela casa comercial
- b) Intervalos calculados de acordo com especificações para a técnica

AEQ

A avaliação externa da qualidade (AEQ) é um aspecto essencial nas operações laboratoriais. A AEQ fornece um método de assegurar a *performance* analítica do laboratório, comparando este com outros laboratórios que utilizam os mesmos métodos e os mesmos instrumentos.

Para desenvolver uma comparação entre laboratórios que efectuem testes de diagnóstico, a AEQ mede a precisão do laboratório utilizando amostras *cegas* que são analisadas e tratadas como amostras de pacientes por cada um dos laboratórios participantes. Os resultados são enviados para a entidade organizadora do programa para análise estatística. O relatório final compara a *performance* individual de cada laboratório com todos aqueles que participam no programa e é enviado a cada um dos laboratórios. (Ltd.)

A participação em programas de AEQ ajuda a produzir resultados confiáveis e precisos, e apresenta múltiplas vantagens (Tab. VIII). Resultados com qualidade irão reduzir o tempo e o custo da sua realização, e acima de tudo, irão fornecer aos

doentes resultados precisos relativamente ao seu diagnóstico e possível tratamento.
(Fig. 15)

Tabela VIII - **Vantagens de um programa de AEQ**

Avaliação Externa da Qualidade
Manter e melhorar a qualidade analítica dos testes laboratoriais
Melhorar a concordância inter-laboratorial e elevar os padrões analíticos
Detectar falhas em equipamento, identificar problemas em reagentes, e rever os procedimentos da equipa técnica
Inicializar e avaliar acções correctivas
Comprar diferentes métodos analíticos

Tendo em conta o cenário macroeconómico actual, a escolha dos parceiros para efectuar a avaliação externa laboratorial deve atender principalmente às especificidades dos métodos, aos relatórios interpretativos produzidos e também ao seu custo. Para o mesmo leque de parametrizações podem observar-se discrepâncias no seu custo que justificam a elaboração de um plano anual de AEQ por diferentes programas. Nesta fase do estágio fiz parte da equipa que estudou, planeou e concluiu a distribuição das áreas de AEQ pelos diferentes programas, com o objectivo de reduzir o custo dos mesmos, mantendo a mesma fiabilidade dos resultados.

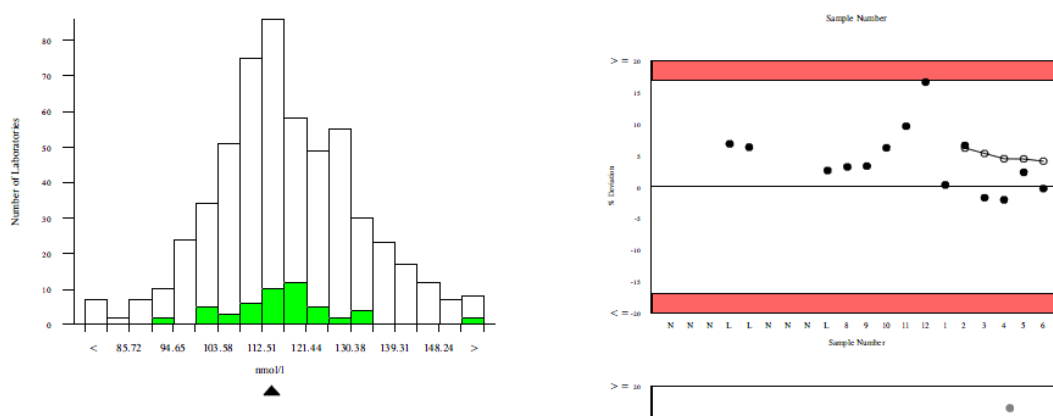


Figura 15 – **Parte do relatório RIQAS para o parâmetro FT4**

O Laboratório R&S S.A., participa, actualmente, em quatro programas distintos: I.N.S.A. (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge); RIQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Services*); A.E.F.A. (Associação Espanhola de Farmacêuticos Analistas) e S.E.Q.C. (Sociedade Espanhola de Química Clínica) (Tab. IX).

Tabela IX - Programas de AEQ do Laboratório R&S S.A.

I.N.S.A.	R.I.Q.A.S.
Hematologia (Contagem diferencial leucocitária; Contagem Celular em Sangue total)	Hemograma, leucograma e plaquetas
Velocidade de Sedimentação	Bioquímica clínica
Hemoglobina glicada	Imunologia e endocrinologia
Grupo sanguíneo e factor Rh	Tempo de Protrombina e PTT
Tempo de Protrombina e PTT	ToRCH
Anticorpos VIH	
Hepatite B e C	
Urocultura	
Trimestralmente	Mensalmente

15.6.2. Validação Biopatológica de resultados

A validação final biopatológica de resultados é o procedimento final antes da conclusão de determinado pedido, verifica-se nesta fase a concordância de todos os parâmetros analíticos com o processo individual de cada utente e o seu historial clínico. É também nesta fase que o director técnico avalia a necessidade de contacto com o clínico prescritor ou com o utente, de forma a confirmar algum resultado ou requisitar uma nova colheita.

15.7. Conclusão

Embora já desempenhe a minha actividade profissional na área das análises clínicas desde o término do ano 2012, a realização deste estágio permitiu uma consolidação da informação teórica adquirida tanto neste mestrado que agora termina, como também no mestrado anterior, que focaliza a vertente do medicamento e do agente de saúde pública, ligando ambos e permitindo uma envolvência bastante maior entre eles. O estágio permitiu-me: testar e controlar os métodos usados na execução das análises clínicas, colaborar na obtenção das amostras e sua manipulação, informação e preparação dos doentes para a correcta obtenção das mesmas, elaboração dos procedimentos de trabalho para os equipamentos e procedimentos analíticos, controlar a qualidade técnica e instrumental e a manutenção dos equipamentos, colaborar na implementação de novos procedimentos, participar nos programas de formação nos quais esteja implicado o laboratório, colaborar na continuidade de melhoria do processo de certificação da qualidade, participar em programas inter-laboratoriais de avaliação externa da qualidade e trabalhar em equipa multidisciplinar focalizada no utente.

A abrangência das análises clínicas e as suas plurivalências, obrigam cada vez mais a uma formação direccionada. O aprofundamento progressivo do conhecimento educacional em determinada área específica é cada vez mais necessário, e permitirá com mais facilidade a obtenção de resultados profissionais e pessoais proveitosos e com qualidade.

Embora tenha terminado o estágio em análises clínicas, sinto que a minha formação não terminou, antes pelo contrário. Assim, é meu desejo melhorar e, por isso, permanecer em constante aprendizagem durante o percurso profissional, regendo-me na minha prática diária por elevados padrões morais, éticos e deontológicos de modo a dignificar e a exercer cada vez melhor o meu papel de Farmacêutico.

16. Bibliografia

Arkray Inc. (2010). *Automatic Glycohemoglobin Analyzer ADAMS (Diabetes) ADAMS A1c HA-8180*. Tóquio, Japão: Arkray Inc.

bioMérieux SA. (2010). VIDAS Anti-Hbs Total Quick (HBST) - PT. *Princípio do Teste*. Marcy l'Etoile, França: bioMérieux SA.

bioMérieux SA. (2005). *VITEK® 2 Compact Operation Summary*. Marcy l'Etoile, França: bioMérieux SA.

Burtis, C. A., & Bruns, D. E. (2008). *Tietz Fundamentos da Química Clínica* (6ª ed.). California, Estados Unidos da América: Elsevier.

Carter, J., & Saunders, V. (2007). *Virology: Principles and Applications*. Liverpool, Reino Unido: John Wiley & Sons.

Fauci, A., & Braunwald, D. (2002). *Harrison – Medicina Interna*. Columbus, Estados Unidos da América: McGraw Hill.

Frade, M. (2005). *Acreditação 15189: Garantia de competência técnica e fiabilidade dos resultados*. Lisboa, Portugal: APAC - 17º Encontro Científico.

Garcia, S. L. (2007). *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (2ª ed.). Santa Monica, Estados Unidos da América: ASM Press.

Gardner, D., & Shoback, D. (2007). *Clinical Endocrinology* (8ª ed.). Greenspan's Basic.

Gomes, M. (2008). *Avaliação de Laboratório Clínicos*. IPAC - Seminário Clínico.

Hall, J. E., & Nieman, L. K. (2003). *Handbook of Diagnostic Endocrinology (Contemporary Endocrinology)*. Nova Iorque, Estados Unidos da América: Humana Press.

Hipólito-Reis, C., Nuno, M., & Alçada, I. A. (2002). *Práticas de Bioquímica para as Ciências da Saúde*. Lisboa, Portugal: Lidel.

Hoffbrand, V., Moss, P., & Pettit, J. (2006). *Essencial Haematology*. Blackwell Science.

Laso, F. J. (2005). *Patología General*. Barcelona, Espanha: Masson.

Lewis, S. M., Bain, B. J., & Bates, I. (2001). *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Edimburgo, Reino Unido: Churchill Livingstone.

Ltd., R. L. (s.d.). *EQA Scheme RIQAS*. Obtido em 02 de Agosto de 2012, de <http://www.randox.com/EQA-Scheme-RIQAS.php>

McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2006). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (21 ed.). Saunders.

Menarini Diagnostics - Portugal. (s.d.). *Ves-Matic 30 Plus*. Obtido em 25 de 07 de 2012, de Menarini Diagnostics: <http://www.menarinidiag.pt>

Mesquita, L., & Pimentel, M. (2000). *Tecnologias da Saúde*. Porto: Instituto de Emprego e Formação Profissional.

Parslow, T. G. (2001). *Medical Immunology*. Los Angeles, Estados Unidos da América: Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division.

Roche Diagnostics GmbH. (2005). *Cobas 6000 User's Manual*. Roche Diagnostics.

Roche Diagnostics Inc. (2006). *Cobas e411 Analyzer Operator's Manual*. Mannheim, Alemanha: Roche Diagnostics Inc.

Roche Diagnostics Inc. (2010). *HIV combi - HIV-I antigen and total antibodies to HIV-I and HIV-2. Summary*. Mannheim, Alemanha: Roche Diagnostics Inc.

S., K., I.D., W., T.A., W., & F.E., P. (1994). *Thromboplastin related differences in the determination of international normalised ratio: a cause for concern?* Londres, Reino Unido: Steering Committee of the UK National External Quality Assessment Scheme in Blood Coagulation.

Sysmex Company. (2004). *Sysmex XT1800i and XT2000i series - Versão Portuguesa*. Porto, Portugal: Sysmex Company.