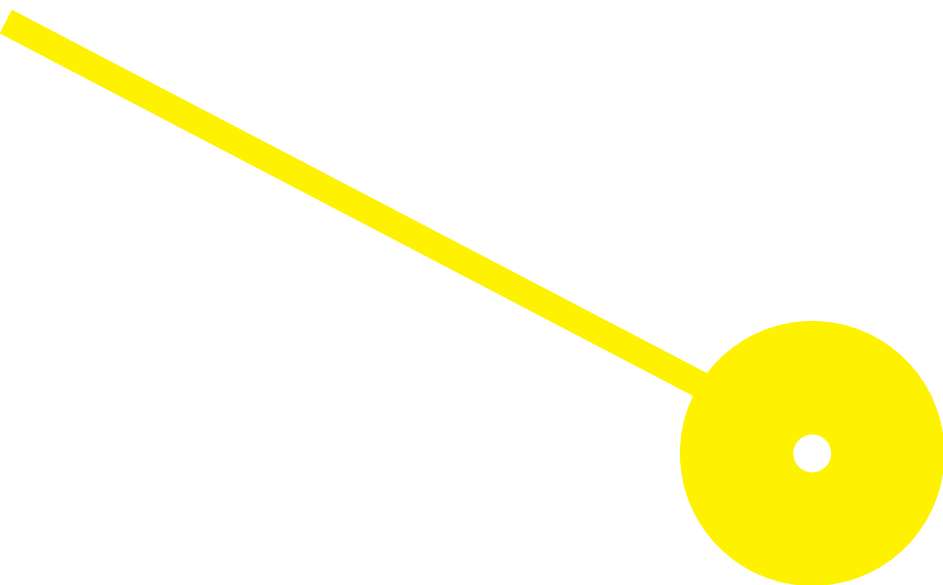




A relação dos valores de procalcitonina com os microrganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS em 2022

Ana Rita Leite da Silva

09/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



A relação dos valores de procalcitonina com os microrganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS em 2022

Autor

Ana Rita Leite da Silva

Orientadores

Professor Especialista em ACSP Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), ESS|PPorto
Especialista em Microbiologia Clínica, Dra Maria Mariana Fernandes Bettencourt Viana, Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar Tâmega e Sousa
Professor Especialista em ACSP Maria Céu Ribeiro Lamas, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), ESS|PPorto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – Ramo **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram e apoiaram durante toda a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, não podia deixar de agradecer às minhas orientadoras Prof. Maria Manuela Amorim, Prof. Maria do Céu Lamas e Dra. Mariana Viana, por toda a ajuda e orientação ao longo de todo o trabalho.

Em segundo lugar, a todos os professores do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto. Muito obrigada por todos os ensinamentos ao longo de toda a formação.

Um agradecimento especial a todos os funcionários do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa, por me terem recebido de braços abertos, por todo o apoio, compreensão e formação ao longo de todo o estágio.

À minha família, principalmente aos meus pais, por estarem sempre do meu lado e por sempre terem dado o seu máximo para que eu possa cumprir os meus objetivos. Muito obrigada.

Ao João, por ter estado sempre presente nos bons e nos maus momentos para me dar força. Por toda a paciência, compreensão e carinho. Muito obrigada.

Não poderia deixar de agradecer às minhas amigas, Inês, Maria Inês e Patrícia, por me apoiarem sempre e por estarem presentes em todos os momentos quer sejam bons ou maus. Muito obrigada do fundo do coração.

Por fim, mas não menos importante, à minha fiel companheira de estágio, Sofia, por toda a ajuda, companheirismo, amizade e apoio.

Obrigada a todos.

Resumo

Este relatório de Estágio está estruturado em dois capítulos. O capítulo I refere as atividades realizadas no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa (CHTS). O objetivo do estágio realizado no laboratório clínico consistiu em integrar os conhecimentos adquiridos no Mestrado e desenvolver e solidificar competências laboratoriais e interpessoais. No capítulo II desenvolve-se um estudo sobre “A relação dos valores de procalcitonina com os microrganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS em 2022”.

O objetivo deste estudo é avaliar a existência de uma relação direta entre os valores de procalcitonina e os microrganismos isolados em hemoculturas positivas. Neste capítulo foram analisados os registos de resultados referentes a 336 episódios de hemocultura positivas e procalcitonina de 282 doentes, realizadas 2022.

No presente estudo os valores de procalcitonina não variaram em função do sexo ($p=0,114$) e do tipo de microrganismos isolados de hemoculturas ($p=0,154$). Neste seguimento, a procalcitonina poderá vir a ser considerada um biomarcador com valor preditivo para avaliação do risco de septicemia, de acordo com os pontos de corte estabelecidos para categorizar os níveis de risco.

Numa perspetiva futura seria importante a realização de mais estudos com abordagens mais eficazes e personalizadas na gestão de infeções e da septicemia.

Palavras-chave: Hemocultura; Procalcitonina; Septicemia; Microbiologia; Microrganismos

Abstract

This Internship report is structured into two chapters. Chapter I refers to the activities carried out in the Clinical Pathology service of the Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa (CHTS). The objective of the internship carried out in the clinical laboratory was to integrate the knowledge acquired in the Master's degree and develop laboratory and interpersonal skills.

Chapter II develops a study on "The relationship between procalcitonin values and the microorganisms present in positive blood cultures in CHTS patients in 2022".

The objective is to evaluate the existence of a direct relationship between procalcitonin values and the microorganisms isolated in positive blood cultures. The results records relating to 336 positive blood culture and procalcitonin episodes of 282 patients, carried out in 2022, were analyzed.

In this study, procalcitonin values did not vary depending on sex ($p=0.114$) and the type of microorganisms isolated from blood cultures ($p=0.154$). In this context, procalcitonin could be considered a biomarker with predictive value for assessing the risk of septicemia, according to the cutoff points established to categorize risk levels.

From a future perspective, it would be important to carry out more studies with more effective and personalized approaches to the management of infections and septicemia.

Keywords: Blood culture; Procalcitonin; Septicemia; Microbiology; Microorganisms

Índice

Capítulo I: Estágio	11
1. Caracterização do Local de Estágio	11
2. Objetivos do Estágio.....	2
3. Atividades Desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Clínica.....	2
3.1. Equipamentos.....	3
3.1.1. BD BACTEC™ 9000.....	3
3.1.2. BD BACTECTM MGIT™ 320.....	4
3.1.3. VITEK® 2.....	5
3.1.4. Aerospray® Gram Slide Stainer e Aerospray® TB Slide Stainer	6
3.1.5. Sistema GeneXpert®	6
3.2. Processamento de Produtos Biológicos	7
3.2.1. Meios de cultura.....	7
3.2.2. Testes de Identificação e Triagem Microbiana.....	8
3.2.2.1. Coloração de Gram	8
3.2.2.2. Coloração de Auramina	8
3.2.2.3. Prova Catalase	9
3.2.2.4. Prova Coagulase	9
3.2.2.5. Prova Oxidase	10
3.2.2.6. Teste PYR	10
3.2.2.7. Prova Filamentação.....	10
3.2.2.8. Prova de Sensibilidade a Antibióticos específicos.....	11
3.2.2.9. Teste PBP2a.....	11
3.2.2.10. Pesquisa de antígeno e toxina de Clostridium difficile nas fezes.....	12
3.2.2.11. Detecção de carbapenemases	13
3.2.2.12. Detecção do antígeno A do Streptococcus pyogenes	14
3.2.2.13. Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana	14
3.2.2.14. Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus nas Fezes	15
3.3. Principais Produtos Processados no Laboratório de Microbiologia.....	15
3.3.1. Urinas	16
3.3.2. Hemoculturas	16
3.3.3. Cateter Venoso Central.....	17
3.3.4. Secreções Brônquicas, Lavados Brônquicos e Broncoalveolares	18
3.3.5. Fezes.....	18
3.3.6. Zaragatoa Retal	19

3.3.7.	Exsudados	20
3.3.7.1	Exsudado Nasal	20
3.3.7.2	Exsudado Vaginal	20
3.3.7.3	Exsudado Purulento	21
3.3.8.	Tecidos e Ossos	21
3.3.9.	Líquidos das Cavidades Naturais	22
3.3.10.	Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	22
3.3.11.	Micobactérias	23
3.4.	Controlo de Qualidade	24
3.4.1.	Controlo de Qualidade Interno (CQI)	25
3.4.2.	Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	25
4.	Conclusão	26
Capítulo II - Estudo de Caso: A relação dos valores de procalcitonina com os microrganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS em 2022		27
1.	Introdução	27
1.2.	Classificação das Infecções da Corrente Sanguínea	29
1.3.	Principais Microrganismos Isolados em Hemoculturas e Significado	30
2.	Objetivo	35
3.	Materiais e Métodos	35
3.1.	Desenho do estudo	35
3.2.	Amostra	35
3.3.	Procedimentos	35
3.4.	Análise Estatística dos Dados	36
3.5.	Considerações Éticas	36
4.	Resultados	37
5.	Discussão	42
6.	Conclusão	44
7.	Referências Bibliográficas	45
Anexos		53

Índice de Figuras

Figura 1- Fluxo das amostras no laboratório de microbiologia.....	3
Figura 2- BD BACTEC™ MGIT™ 320 (9).....	4
Figura 3- BD BBL™ MGIT™ (10).....	4
Figura 4- Vitek® 2 (11).....	6
Figura 5- Cartas usadas pelo Vitek® 2 (11).....	6
Figura 6- Aerospray® Gram Slide Stainer (13).....	6
Figura 7- Aerospray® TB Slide Stainer (14).....	6
Figura 8- Cartucho Xpert® Xpress CoV-2/Flu/RSV plus (77).....	7
Figura 9- Sistema GeneXpert® (15).....	7
Figura 10- Mycobacterium tuberculosis usando coloração de Auramina. Adaptado de (19).....	9
Figura 11- Interpretação de resultados do teste (22).....	11
Figura 12- Reagentes e tira teste do kit CLEARVIEW™ PBP2a SA CULTURE COLONY TEST (22).....	11
Figura 13- Padrão de resultados possíveis para a pesquisa de antígeno e toxina de Clostridium difficile nas fezes. Adaptado de (81).....	12
Figura 14- Resultados possíveis para o teste O.K.N.V.I. RESIST-5 (24).....	13
Figura 15- Pirâmide de diagnóstico de uma hemocultura (73).....	30

Índice de Tabelas

Tabela 1- Interpretação dos resultados de PCT para avaliação de risco para septicemia grave e/ou choque séptico.....	36
Tabela 2- Valores médios de procalcitonina em função do sexo.....	37
Tabela 3- Frequência absoluta e relativa da procalcitonina em função dos níveis de risco.....	38
Tabela 4- Comparação dos valores médios de procalcitonina considerando o tipo de microrganismos presentes nas hemoculturas.....	39
Tabela 5- Comparação dos valores médios de procalcitonina em função do sexo.....	40
Tabela 6 médios de procalcitonina em função da tipologia de microrganismos.....	42

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACES	Agrupamento de Centros de Saúde
ACSP	Análises Clínicas e Saúde Pública
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CHTS	Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERC	<i>Enterobacteriaceae</i> Resistentes aos Carbapenemos
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility</i>
GDH	<i>Clostridium difficile</i> glutamato desidrogenase
ICS	Infeções da Corrente Sanguínea
IMP	Imipenemase Metalo betalactamase
INEM	Instituto Nacional de Emergência Médica
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ITU	Infeção do Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
NAC	Mucolítico N-acetilcisteína
NC	Número de computador
NDM	Nova Deli Metalo-betalactamase
ng	Nanogramas
Oxa-48	Oxacilinase tipo 48
PCR	Reação em cadeia da polimrase, do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	Procalcitonina
PET	Tomografia por Emissão de Protões
pH	Potencial Hidrogeniónico
PSA	Antigénio Específico da Próstata
PYR	Pirrolidonil Arilamidase
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SCS	<i>Smart Carrier Station</i>
SPC	Serviço de Patologia Clínica
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

TSDT Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica

Lista de Abreviaturas e Siglas (cont.)

UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UHA	Unidade Hospitalar de Amarante
UHPA	Unidade Hospitalar Padre Américo
UK NEQAS	<i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>
VIM	<i>Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase</i>

Organização do Relatório

O presente Relatório insere-se no âmbito da unidade curricular Estágio, para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública (ACSP), na área de Microbiologia e Saúde Pública, na ESS|P.Porto. É constituído por dois capítulos:

- Capítulo I - contextualiza o estágio, objetivos, metodologias apreendidas e praticadas no Laboratório Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica CHTS;
- Capítulo II – integra o estudo de caso “A relação dos valores da procalcitonina com os microrganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS no ano 2022”.

Capítulo I: Estágio

1. Caracterização do Local de Estágio

O Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública (ACSP) da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto tem como objetivo conferir aos estudantes conhecimentos nos diferentes domínios das Análises Clínicas e Saúde Pública, acompanhando o avanço científico e tecnológico da atualidade. O estágio curricular é o culminar do segundo ano do mestrado, cujo objetivo é solidificar competências e capacitar o estudante em contexto real de trabalho. Deste modo, o aluno consegue integrar e aprofundar os conhecimentos e competências de várias metodologias usadas em laboratórios de Análises Clínicas.

Este Estágio foi realizado no setor da Microbiologia do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa (CHTS), em Penafiel, de setembro de 2022 até fevereiro de 2023. Durante este período foi possível acompanhar a rotina e o fluxo de trabalho do laboratório, bem como, a respetiva interpretação dos resultados, e integrar a equipa multidisciplinar.

Na região do Vale do Sousa, os cuidados de saúde são assegurados pelo CHTS, agrupamentos de Centros de Saúde (ACES) e as Unidades de Saúde Familiar, estruturas Hospitalares das Misericórdias existentes nos concelhos da região, rede de apoio pré-hospitalar em articulação com o Instituto Nacional de Emergência Médica (INEM) e Unidades Protocoladas com a Rede Nacional de Cuidados de Saúde.

O CHTS é constituído pela Unidade Hospitalar Padre Américo (UHPA), em Penafiel, e pela Unidade Hospitalar de Amarante (UHA). Tem uma área de referência que abrange 12 Concelhos, com uma área geográfica total de 1988,28 Km², englobando um total de 520 000 habitantes, com muita da população envelhecida.

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) encontra-se integrado no Departamento de Ambulatório e Ligação Funcional do CHTS, estando sob direção da Dra. Maria Calle Vellés. É composto por dois laboratórios em localizações diferentes, o Laboratório Central na Unidade Hospitalar Padre Américo e Laboratório de Apoio à Urgência Básica na Unidade Hospitalar de Amarante. O Laboratório central (localizado na UPA) é constituído pelos Setores de Hematologia, Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Biologia Molecular.

A atividade assistencial é a principal área de intervenção do Serviço, tendo por base o diagnóstico clínico-laboratorial, *follow-up* analítico e prognóstico de patologias. Os pedidos analíticos são provenientes do internamento, urgência, ambulatório e consulta externa. Para prestar esta assistência, o laboratório recorre a metodologias laboratoriais adequadas que são interpretadas e validadas de forma a disponibilizar resultados fidedignos e em tempo útil. Em alguns casos recorre a laboratórios exteriores para a realização de parâmetros analíticos não implementados no serviço.

Em particular o laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular funciona 24 horas por dia, realizam as análises provenientes dos serviços de urgência, internamento e consultas externas, e tem como recursos humanos especializados 4 técnicos de ACSP e 2 Médicos Patologistas.

2. Objetivos do Estágio

Este estágio tem como objetivo principal aprofundar os conhecimentos e competências na área Microbiologia Clínica, e adquirir competências interpessoais através do acompanhamento e interação de equipa multidisciplinar que constitui o laboratório central.

3. Atividades Desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Clínica

O laboratório de microbiologia clínica tem um papel fundamental no diagnóstico dos microrganismos que causam doenças infecciosas das preferencialmente rapidez e eficácia nos resultados o laboratório encontra-se dividido em duas áreas de trabalho: 1) a área 1 onde são admitidos os seguintes produtos como urinas, hemoculturas, cateteres, líquidas cavidades naturais. 2) a área 2 onde são admitidos os seguintes como fezes, exsudados, secreções e lavados brônquicos, tecidos e ossos e os produtos para o rastreio de CARBA/OXA. Posteriormente, procede-se à avaliação dos produtos, a partir do qual é realizada uma lista de trabalho para processamento das análises que são necessárias realizar que permitirão o isolamento e a identificação dos microrganismos e o seu respetivo teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA), sempre que se justifique.

Para o sucesso no diagnóstico e obtenção de resultados rigorosos é fundamental que todas as normas para colheita, transporte, conservação, processamento e armazenamento das

amostras biológicas sejam cumpridas. Para além disso, torna-se importante o conhecimento do tipo de flora normal de cada local anatómico e os possíveis contaminantes de cada amostra. Na Figura 1 encontram-se representados os processos que as amostras seguem, desde o momento da colheita até à obtenção dos resultados. Para o efeito à que atender aos equipamentos instalados como recursos no laboratório assim como o sistema de Gestão de Garantia da Qualidade, através da realização do controlo de qualidade interno e externo.

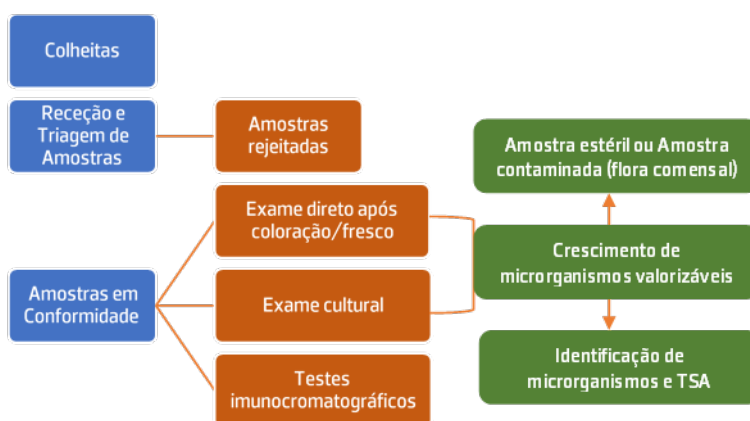


Figura 1- Fluxo das amostras no laboratório de microbiologia

3.1. Equipamentos

Apesar da Microbiologia ser, ainda, uma área manual o recurso a estes equipamentos tem aumentado (1,2), para a identificação antimicrobiana e testes de suscetibilidade (TSA), assim como para as colorações e deteção de crescimento microbiano.

No laboratório de Microbiologia estão implementados os equipamentos a seguir descritos, com os quais foi possível contactar durante o período de estágio.

3.1.1. BD BACTEC™ 9000

O BD BACTEC™ 9000 é um equipamento automatizado para detetar o crescimento microbiano em garrafas de hemocultura (3). Por outro lado, contribui para a diminuição da realização de exames adicionais, do tempo de internamento e, conseqüentemente, dos custos associados (4).

Uma vez que muitos dos doentes no momento da colheita já iniciaram antibioterapia, o que pode afetar o crescimento do microrganismo presente na amostra, são usados frascos que contêm resinas. Estas resinas inibem e neutralizam a maior parte dos antibióticos e não afetam as leituras das colorações de Gram(5–7).

A metodologia deste equipamento baseia-se na detecção da fluorescência emitida por um sensor presente nas garrafas. Durante o crescimento os microrganismos metabolizam os substratos presentes no meio de cultura, consomem O_2 e libertam CO_2 . O aumento do CO_2 provoca um aumento da fluorescência no sensor do frasco que é monitorizado pelo equipamento (3,4,8) a cada 10 minutos, aumentando assim a eficácia na detecção de amostras positivas, por emissão de alarmes sonoros e visuais no caso de crescimento microbiano. Caso não seja detetado nenhum microrganismo antes, o tempo de incubação é de 5 dias a uma temperatura de $37^\circ C$ e as culturas são consideradas negativas (3). No Anexo 1 estão representados os tipos de garrafas usados no laboratório de microbiologia do CHTS e a função de cada uma delas.

3.1.2. BD BACTECTM MGIT™ 320

O BD BACTEC™ MGIT™ 320 é um equipamento automatizado para cultura de micobactérias(9). Tem como objetivo o diagnóstico clínico-laboratorial de tuberculose, permitindo a obtenção de resultados mais rápidos relativamente aos métodos manuais(9).

Os tubos de cultura BD BBL™ MGIT™ (Figura 3) contêm um composto fluorescente que é sensível à presença de oxigénio dissolvido no meio(9,10). O crescimento de microrganismos dá-se com consumo do oxigénio do meio e, conseqüentemente, a produção de fluorescência que será detetada pelo equipamento(9).



Figura 2- BD BACTEC™ MGIT™ 320 (9)



Figura 3- BD BBL™ MGIT™ (10)

3.1.3. VITEK® 2

O VITEK® 2 (Figura 4) é um equipamento automatizado que permite identificação de microrganismos e sensibilidade aos antimicrobianos de forma rápida(11). Estão subjacentes 2 grupos de cartas nomeadamente para a identificação e para o antibiograma (Figura 5) (Anexo 2) (11,12). As cartas de identificação contêm poços com substratos bioquímicos e as cartas de TSA, diversas concentrações de antibióticos nos poços(12).

Para a utilização das cartas é necessário preparar, previamente, uma suspensão a partir de colónias isoladas e puras em 3mL de solução salina (0,45% NaCl) com uma turbidez ajustada a cada grupo de microrganismos (Anexo 2), para o efeito neste laboratório é usado o DensiCheck (12).

Após a preparação da suspensão os tubos de ensaio e as respetivas cartas são inseridas numa cassette e colocadas no *Smart Carrier Station* (SCS) para que os códigos de barras das cartas sejam associados aos processos dos respetivos utentes(12). Em seguida, a cassette é introduzida no sistema VITEK 2. Depois de introduzida no aparelho a cassette é carregada através de um sistema de vácuo, sendo posteriormente, selada e colocada num carrossel de incubação(12). Todas as cassetes são incubadas a 35°C e sujeitas a leituras a cada 15 minutos. Em cada leitura é medida a alteração da transmissão de luz provocada pelo crescimento dos microrganismos e pelas reações em cada poço(12). Após as leituras, os resultados são transmitidos para software de acordo com o mapa da carta e mais tarde validados.

Para a identificação de microrganismos o software compara os resultados obtidos com uma base de dados, tentando encontrar o mesmo padrão de resultados. Se nenhum dos resultados for compatível com um microrganismo da base de dados o sistema apresenta uma lista de possibilidades, ou então, indica que não é possível efetuar a identificação. Os resultados dos TSA são interpretados de acordo com a concentração mínima inibitória (CMI) de cada antibiótico e comparados com normas da European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)(12).



Figura 4- Vitek® 2 (11)

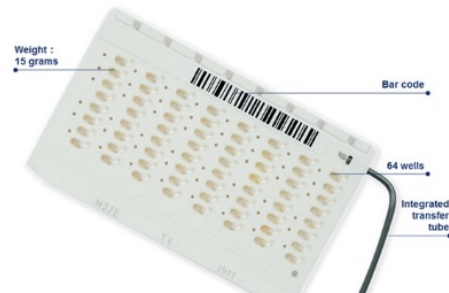


Figura 5- Cartas usadas pelo Vitek® 2 (11)

3.1.4. Aerospray® Gram Slide Stainer e Aerospray® TB Slide Stainer

O Aerospray® Gram Slide Stainer (Figura 6) é um aparelho automatizado para coloração de Gram(13). O Aerospray® TB Slide Stainer (Figura 7) é um aparelho automatizado para coloração de lâminas usadas para a detecção de bacilos álcool-ácido resistentes(14).

A utilização destes aparelhos apresenta diversas vantagens na rotina e fluxo de trabalho do laboratório, por serem de fácil utilização e permitirem economizarem tempo face às metodologias manuais, acresce o facto de terem programas de limpeza incorporados no equipamento que permitem reduzir a quantidade de manchas nas lâminas e, conseqüentemente, facilitar a leitura ao microscópio(13,14).



Figura 6- Aerospray® Gram Slide Stainer (13)



Figura 7- Aerospray® TB Slide Stainer (14)

3.1.5. Sistema GeneXpert®

O Sistema GeneXpert® (Figura 8) é um equipamento automatizado que utiliza técnicas de biologia molecular para a detecção de genes. Devido ao seu sistema modular permite que o laboratório realize testes de diagnóstico molecular independentemente da estrutura, tamanho e volume de amostras(15).

Este sistema baseia-se numa tecnologia de cartuchos descartáveis (Figura 9) de uso único, onde no interior do mesmo, ocorre toda a reação de PCR em tempo real. Uma vez que os cartuchos são independentes para cada teste a contaminação cruzada de amostras é praticamente nula(15).

O equipamento integra todas as etapas necessárias até à obtenção dos resultados, a preparação da amostra, amplificação dos ácidos nucleicos e a deteção das sequências-alvo nas amostras, utilizando PCR (15), permitindo a obtenção mais rápida dos resultados comparativamente às metodologias convencionais. No Anexo 3 encontram-se representados os testes disponíveis no CHTS.



Figura 9- Sistema GeneXpert® (15)



Figura 8- Cartucho Xpert® Xpress CoV-2/Flu/RSV plus (102)

3.2. Processamento de Produtos Biológicos

Para efeitos de isolamento e identificação ao nível da espécie microbiana e respetiva sensibilidade existe uma diversidade de provas implementadas neste laboratório a aplicar de acordo com os protocolos pré-estabelecidos e passamos a descrever neste ponto.

3.2.1. Meios de cultura

Os meios de cultura são um dos pilares fundamentais para o isolamento e identificação de microrganismos. Os requisitos básicos obedecem à existência de uma fonte de nutrientes, um agente solidificante, pH ajustado e podendo incluir outros aditivos específicos(16,17). Os principais meios de cultura usados no Laboratório de Microbiologia do CHTS estão descritos no Anexo 5. A sua utilização obedece aos objetivos funcionais, nomeadamente serem meios enriquecidas, seletivos e não seletivos, meios diferenciais e meios especializados-

3.2.2. Testes de Identificação e Triagem Microbiana

A identificação contempla diversos aspectos; morfologia macroscópica da colônia, morfologia microscópica e características da coloração de Gram, exigências nutricionais e capacidade metabólica.

Para a identificação dos microrganismos podem ser usadas metodologias manuais, semiautomatizadas ou automatizadas, que se complementam entre si. O VITEK[®] 2, referido anteriormente, é o aparelho automatizado usado no laboratório do CHTS para a identificação de microrganismos.

3.2.2.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram (Anexo 5) tem como objetivo a diferenciação de bactérias com base nas características da parede celular(17,18). Desta forma as bactérias Gram positivo expressam coloração azul/roxo porque possuem uma parede celular espessa, rígida e composta por ácidos teicóicos. Enquanto as bactérias Gram negativas coram de rosa/vermelho, pela sua parede celular ser mais complexa, com menor teor de peptidoglicano e não possui ácidos teicóicos (17,19,20).

3.2.2.2 Coloração de Auramina

A coloração de Auramina baseia-se na propriedade de álcool-ácido resistência das micobactérias, e é comumente usada para a detecção de Micobactérias, com particular interesse na pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis*. Após a coloração das lâminas, cujo procedimento está esquematizado no Anexo 6, estas serão visualizadas por microscopia de fluorescência. O corante Auramina liga-se aos ácidos micólicos da parede celular das micobactérias e o corante que não for fixado é removido pela lavagem com a solução álcool-ácido(19). O permanganato de potássio desempenha o papel de corante de contraste, inativando o corante fluorescente que não estiver ligado(17). Os bacilos álcool-ácido coram de verde-amarelados num fundo escuro (Figura 10).

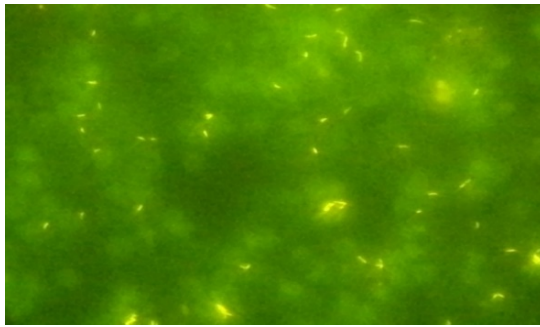


Figura 10- *Mycobacterium tuberculosis* usando coloração de Auramina. Adaptado de (19)

3.2.2.3 Prova Catalase

A prova da catalase permite detectar a presença da enzima catalase (18,19) o peróxido de hidrogênio agindo como um mecanismo de defesa do microrganismo(18). Quando ocorre efervescência, devido à liberação de oxigênio, considera-se que o microrganismo é catalase positivo, e quando não ocorre efervescência será considerado catalase negativo(18).

Como exemplo de microrganismos catalase positivo temos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus spp.*. Os *Enterococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* são exemplos de microrganismos catalase negativo(19).

3.2.2.4 Prova Coagulase

A prova da coagulase permite averiguar a capacidade de o microrganismo produzir a enzima coagulase. É usado na diferenciação de *Staphylococcus aureus* de outros *Staphylococcus spp.* – *Staphylococcus* coagulase negativos. Esta enzima atua como um fator plasmático convertendo o fibrinogênio em fibrina. A formação de coágulo ou grumos caracteriza uma reação positiva e a ausência de coágulo ou grumos indica uma reação negativa(18,19).

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo coagulase positivo. Por outro lado, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* são exemplos de microrganismos coagulase negativa (17–19).

3.2.2.5 Prova Oxidase

A prova da oxidase permite detetar a produção da enzima citocromo oxidase em bactérias Gram negativo que tenham o oxigénio como recetor final de eletrões na respiração celular. Permite a diferenciar, por exemplo entre as famílias Gram negativo com especial as famílias *Pseudomonadaceae* (oxidase positiva) e *Enterobacteriaceae* (oxidase negativa) (17–19). O aparecimento de uma cor azul-escuro/roxo indica uma reação positiva. Uma reação negativa não causa qualquer tipo de mudança de cor.

Pseudomonas aeruginosa, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni* são exemplos de bactérias oxidase positivas. Por outro lado, as bactérias *Escherichia Coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, *Proteus spp.* e *Haemophilus spp.* são oxidase negativas (17–19).

3.2.2.6 Teste PYR

O teste da PYR é utilizado para a deteção da hidrólise de L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) na identificação presuntiva rápida de *Streptococcus* e *Enterococcus*(17,19). A PYR é hidrolisada pelas bactérias que possuem a enzima pirrolidonil peptidase. Se a pirrodonil peptidase estiver presente é libertada a β -naftilamina que na presença de p-diaminocinamaldeído forma um composto de cor púrpura(17).

O *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus spp.* apresentam uma reação positiva no teste PYR, enquanto os restantes *Streptococcus spp.* são PYR negativos (17,19).

3.2.2.7 Prova Filamentação

A prova da Filamentação avalia a capacidade de as leveduras formarem um tubo germinativo, quando em contacto com soro humano, pelo período de aproximadamente 2 horas à temperatura de 37°C.-A leitura microscópica permite a visualização do tubo germinativo em *Candida albicans* (usada como controlo positivo) ou a ausência dessa estrutura como o caso de *Candida tropicalis* (usada como controlo negativo) (20,21).

3.2.2.8 Prova de Sensibilidade a Antibióticos específicos

A Bacitracina é um antibiótico antiparietal que pode ser usado em discos segundo a metodologia Kirby-Bauer para identificação presuntiva de *Streptococcus β-hemolíticos* (17,18,20).

A formação de um halo ao redor do disco indica que o microrganismo é sensível ao antibiótico e a ausência do halo prova que o microrganismo é resistente. *Streptococcus pyogenes* é sensível à Bacitracina e o *Streptococcus agalactiae* é resistente (17–20).

Os discos de Optoquina são utilizados para o diagnóstico presuntivo de *Streptococcus pneumoniae*, uma vez que este antibiótico lisa os pneumococos à formação de um halo ao redor do disco. Os restantes *Streptococcus α-hemolíticos* são resistentes e por isso não existe a formação de um halo ao redor do disco (17–20).

3.2.2.9 Teste PBP2a

O teste PBP2a é um ensaio imunocromatográfico qualitativo usado na detecção rápida da proteína de ligação à penicilina 2ª (PBP2a) em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)(22). No Serviço de Patologia Clínica do CHTS, atualmente, é utilizado o CLEARVIEW™ PBP2a SA CULTURE COLONY TEST. Os métodos convencionais tendem a demorar muitas horas e por isso, o uso deste teste rápido é uma mais-valia na prática clínica(23).

O procedimento – bastante simplificado – consiste em retirar um pequeno inoculo para um tudo contendo 2 reagentes (Figura 11). É retirada amostra de colónias isoladas A tira teste é inserida no tudo e os resultados são lidos ao fim de 5 minutos e interpretados, conforme Figura 12.



Figura 11- Interpretação de resultados do teste (22)

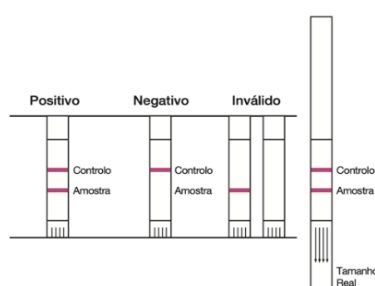


Figura 12- Reagentes e tira teste do kit CLEARVIEW™ PBP2a SA CULTURE COLONY TEST (22)

3.2.2.10 Pesquisa de antígeno e toxina de *Clostridium difficile* nas fezes

O *C. difficile* GDH-toxins A-B Monlab Test[®] é o teste utilizado para a detecção qualitativa de *Clostridium difficile* glutamato desidrogenase (GDH), toxina A e toxina B em fezes humanas. É a principal bactéria anaeróbia relacionada com a diarreia associada a antibióticos e a colite pseudomembranosa em doentes hospitalizados, e submetidos a antibioterapia prolongada. *C. difficile* liberta duas toxinas, toxina A e toxina B, responsáveis pelas manifestações clínicas (diarreia e inflamação)(31). Desta forma, a pesquisa direcionada para as toxinas, permite o diagnóstico precoce permitirá a redução do número de surtos(32).

A GDH é uma enzima produzida por todas as espécies da bactéria, o que a transforma num excelente marcador para a presença de *C. difficile* a partir das fezes (31).

Neste teste rápido a membrana do teste A é pré-revestida com anticorpos monoclonais contra GDH, a membrana do teste B é pré-revestida contra a toxina A e a membrana do teste C é pré-revestida com anticorpos monoclonais contra a toxina B. A amostra reagirá com estes anticorpos presentes nas tiras do teste. O procedimento do teste é bastante simples e consiste na adição de uma pequena amostra de fezes ao tubo que contém o tampão de diluição e homogeneizar. Adicionar 3 gotas na zona da amostra que se encontra na cassete. Ao fim de 15 minutos é possível visualizar os resultados. As interpretações dos resultados possíveis estão representados na Figura 13.

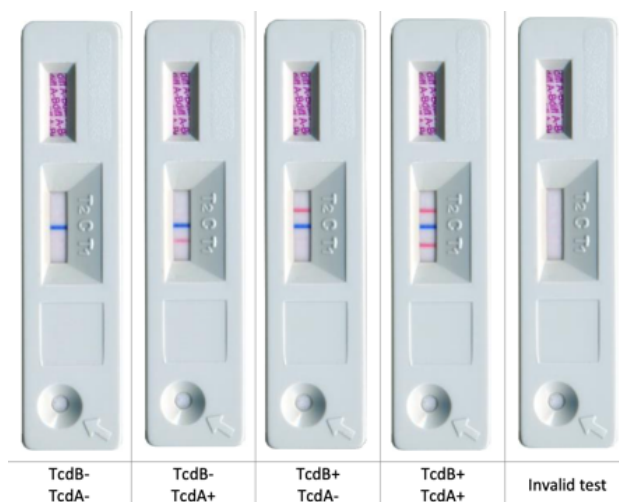


Figura 13- Padrão de resultados possíveis para a pesquisa de antígeno e toxina de *Clostridium difficile* nas fezes. Adaptado de (106)

3.2.2.11 Detecção de carbapenemases

Os organismos produtores de carbapenemases representam uma preocupação importante de Saúde Pública a nível mundial devido ao seu largo espectro de resistência aos antibióticos, incluindo, para além de carbapenemases, a maior parte das classes de agentes antimicrobianos, deixando poucas opções para o tratamento de doentes infetados(24,25).

A NDM e a KPC representam duas das carbapenemases com maior aumento e maior prevalência em muitos países. Por outro lado, as carbapenemases do tipo OXA-48 classe D são o mecanismo de resistência mais desafiante para a deteção em laboratórios clínicos. A carbapenemase VIM não só está presente em Enterobacteriaceae como também é altamente prevalente em bactérias não fermentativas (24).

O teste O.K.N.V.I. RESIST-5 é usado para o diagnóstico rápido e deteção de carbapenemases OXA-48, KPC, NDM, VIM e IMP provenientes de culturas bacterianas. As cassetes do teste incluem uma membrana de nitrocelulose que contém os anticorpos contra as diferentes carbapenemases (24). De acordo com a presença ou ausência de carbapenemases a possibilidade de resultados está expressa na Figura 14.

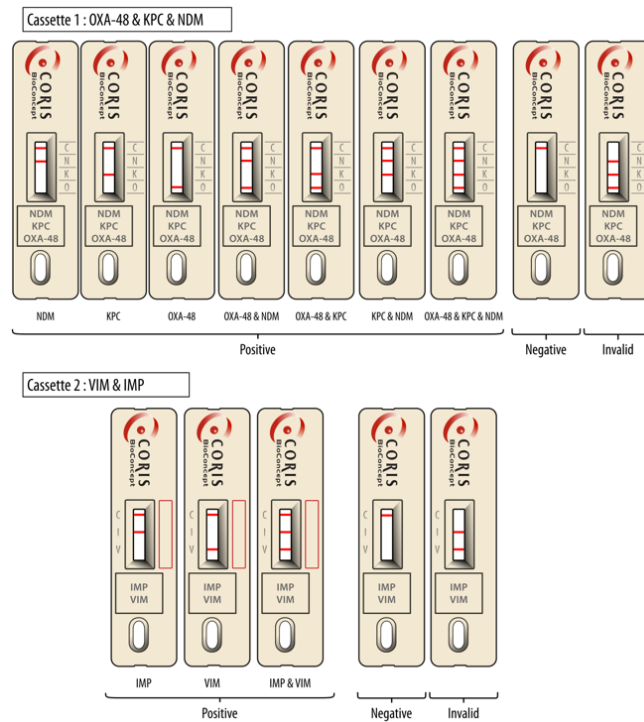


Figura 14- Resultados possíveis para o teste O.K.N.V.I. RESIST-5 (24)

3.2.2.12 Detecção do antígeno A do *Streptococcus pyogenes*

O OSOM[®] Strep A Test é um ensaio rápido imunocromatográfico manual que se destina à deteção qualitativa do antígeno de *Streptococcus* do Grupo A (*Streptococcus pyogenes*), diretamente de uma zangaratoa orofaríngea em apenas 5 minutos(26).

Os *Streptococcus* do Grupo A constituem uma das causas mais importantes de infeções agudas do trato respiratório superior (17,26).

O procedimento implementado no laboratório encontra-se representado no Anexo 7. Para a deteção rápida deste microrganismo basta adicionar 3 gotas de Reagente 1 e 3 gotas de Reagente 2 num tubo de ensaio. Agitar e colocar 1 gota de controlo que o kit disponibiliza. Inserir a zangaratoa no tubo e deixar repousar. Ao fim de 1 minuto colocar a tira teste dentro do tubo e ler os resultados passados 5 minutos. O aparecimento de uma linha teste azul e uma linha controlo vermelha indica um resultado positivo para *Streptococcus* do Grupo A. Um resultado negativo é demonstrado pelo aparecimento apenas da linha vermelha de controlo. Por último, um resultado inválido caracteriza-se pela ausência da linha vermelha ou se a cor de fundo impossibilitar a leitura.

3.2.2.13 Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

O estudo da sensibilidade aos antimicrobianos tem como objetivo a implementação ou ajuste da terapêutica e o estudo de microrganismos multirresistentes(20,27,28).

Para o TSA podem ser usadas metodologias manuais, semiautomatizadas ou automatizadas, que se complementam entre si. O VITEK[®] 2, já referido anteriormente, é o equipamento automatizado utilizado no laboratório do CHTS para a realização de TSA. Este equipamento utiliza métodos de diluição para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de determinados antibióticos presentes nas cartas específicas para determinado grupo de microrganismos(11,17). A CMI é considerada o critério mais confiável para a determinação da suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos(29).

O Método de difusão em disco Kirby-Bauer, metodologia manual e de referência, utiliza discos impregnados em antibióticos em concentrações conhecidas, colocados em meio de cultura sólido, MHE ou MHF dependendo do tipo de bactérias em estudo(28). Com uma suspensão bacteriana de turbidez equivalente a 0,5 McFarland (17,30).

A difusão do antibiótico leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, medido em milímetros após incubação das placas (18–24h a 37±1°C). A medição do halo é inversamente proporcional à CMI. Desta forma, o microrganismo é definido como resistente ou suscetível a determinado antimicrobiano, tendo por base critérios definidos pela EUCAST.

Neste seguimento, é possível utilizar também metodologia de gradiente de concentração dos microbianos: E-test(31). A tira plástica impregnada com antibiótico é colocada numa placa previamente inoculada com uma suspensão bacteriana de turbidez equivalente a 0,5 McFarland (17). Após difusão do antimicrobiano no meio poderá formar-se uma elipse de inibição onde se mede a CMI. Através do valor apresentado consegue definir-se se um microrganismo é resistente ou suscetível ao antimicrobiano, tendo em conta os valores estipulados pela EUCAST(28,31).

3.2.2.14 Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus nas Fezes

Para a pesquisa de Rotavírus e Adenovírus nas fezes é utilizado o Bioline™ ROTA/ADENO. Trata-se de um teste imunocromatográfico qualitativo que deteta a presença destes vírus em amostras fecais humanas (32). O rotavírus e adenovírus são as principais causas de gastroenterite infecciosa em bebés e crianças, embora também possa afetar os adultos(17).

O procedimento do teste baseia-se na adição de 3 a 4 gotas de amostra no poço definido na cassete do teste. Após o período de incubação (aproximadamente 20 minutos) realiza-se a leitura: a presença exclusiva de uma linha de controlo (C) indica um resultado negativo. Um resultado positivo para rotavírus apresenta duas linhas visíveis. Uma linha controlo (C) e uma linha R. Quando aparecem duas linhas roxas C+A indica-nos um resultado positivo para adenovírus. Por fim, um resultado positivo para rotavírus e adenovírus é demonstrado pela presença de todas as linhas acima referidas. Se a linha roxa C não estiver visível na janela do resultado após a realização do teste este é considerado inválido (32).

3.3. Principais Produtos Processados no Laboratório de Microbiologia

Após a chegada dos produtos biológicos ao laboratório é efetuada a triagem dos mesmos mediante os critérios de aceitação ou rejeição de amostras implementado. Asseguradas a conformidade dos mesmos prossegue-se o processamento.

Conforme o protocolado, poderá realizar-se em primeiro lugar a coloração de Gram, enquanto em algumas amostras são realizados, de imediato, os testes rápidos para identificação da presença microrganismos. São também realizadas as sementeiras nos meios de cultura adequados (sempre do menos para o mais seletivo). Decorrido o tempo de incubação o crescimento em culturas é avaliado e avaliada a necessidade de realizar provas complementares para fins de diagnóstico.

3.3.1. Urinas

A infecção do trato urinário (ITU) é uma patologia muito frequente independente do sexo apesar de ser mais prevalente em mulheres (33,34).

A maioria das ITU são causadas pela bactéria *E. coli*, que pertence ao microbioma intestinal, apesar de outras bactérias poderem ser responsáveis pela patologia e, em casos mais raros, a etiologia ser responsabilidade de fungos ou vírus(33,34).

Exame cultural: As uroculturas são semeadas com uma ansa de 1 µL no meio CPSE agar e incubadas a 37°C, para posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. As culturas são observadas e validadas após 18 a 24 horas de incubação, consoante o tipo de colônia, patologia subjacente e o resultado do Gram. As amostras que apresentem um crescimento escasso ficam na estufa mais 24h. Por fim, são realizadas provas de identificação dos agentes etiológicos e de TSA.

Microrganismos mais comuns: Enterobacteriaceae; *Enterococcus*; *Pseudomonas sp.*; *Acinetobacter sp.*; *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Mycobacterium sp.* e *Candida albicans*(30,33,34).

3.3.2. Hemoculturas

São um exame importante para o diagnóstico de infecções sistêmicas causadas por microrganismos (bactérias e fungos)(35). Dada a importância deste produto é importante que colheita seja realizada corretamente, cumprindo todos critérios. É recomendada a colheita de 10 a 20mL de sangue por colheita para hemocultura em adultos (2 a 3 garrafas, uma delas preferencialmente para anaerobiose)(35). Em crianças, o recomendado é a colheita de 1 a 5mL

de sangue em garrafas de hemoculturas pediátricas, já que há um risco acrescido à saúde se houver a retirada de mais de 4% do volume de sangue total do doente(35).

Exame cultural: As hemoculturas são incubadas no equipamento BD BACTEC™ 9000. Durante o período de incubação as amostras consideradas positivas seguem para subcultura, enquanto as negativas permanecem em incubação por mais 5 dias. Findo este período, se se mantiver ausência e crescimento as hemoculturas são consideradas negativas(3). São exceção a pesquisa de micobactérias, em que é necessário um período de incubação até 42 dias.

Nos casos positivos para o isolamento dos microrganismos são usados os meios de cultura MCK, CPSE e PVX utilizando a técnica de sementeira por esgotamento em quadrantes, e é realizado um esfregaço corado pelo método de Gram. Os frascos de hemocultura são preservados na estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ até que a identificação do(s) microrganismo(s) esteja concluída.

Microrganismos mais comuns: *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*(30,35).

3.3.3. Cateter Venoso Central

Estes cateteres são importantes durante a hospitalização dos doentes já que permitem a administração segura de medicamentos e a monitorização de parâmetros hemodinâmicos. Apesar destas vantagens apresentadas estes dispositivos servem também de porta de entrada de microrganismos para o sangue. Assim, quando existe a suspeita de uma possível infecção da corrente sanguínea a ponta do cateter deve ser enviada para o laboratório de microbiologia (36,37).

Exame cultural: A sementeira é realizada no meio COS e PVX utilizando a Técnica de Maki, e após o período de incubação observa-se a existência de crescimento e caso exista semi quantifica-se o mesmo. Desta forma se existirem mais do que 15 UFC/placa pode indicar uma ICS se existir uma hemocultura positiva para o mesmo microrganismo.

Microrganismos mais comuns: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.* e *Corynebacterium spp*(35).

3.3.4. Secreções Brônquicas, Lavados Brônquicos e Bronconalveolares

As infecções do trato respiratório inferior, são uma das principais causas de morte em todo o mundo, incluem bronquite, pneumonia, bronquiolite e tosse convulsa (38). As amostras respiratórias mais frequentemente recebidas neste Laboratório são as secreções brônquicas por emissão. Neste contexto, é extremamente importante controlar o tempo entre a colheita e a chegada ao laboratório para reduzir a possibilidade de contaminação pela flora bucal.

Exame cultural: Antes de realizar o exame cultural é necessário avaliar a qualidade da amostra, segundo a contagem do número de células epiteliais presentes, e o número de leucócitos. Deve conter menos de 10 células epiteliais de descamação por campo com objetiva de 10x e valores de polimorfonucleares >25.

As sementeiras são realizadas por esgotamento por quadrantes nos meios de COS, PVX e MCK e, de seguida, incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Caso não se observem colónias, as placas ficam na estufa mais 24h uma vez que, pode tratar-se de microrganismos mais fastidiosos. Nos casos positivos o crescimento deve ser avaliado semiquantitativamente.

Exame micológico: Quando é solicitado a amostra é colocada num tubo de fundo cónico de 50mL e centrifuga-se a 3300 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante é rejeitado e são semeadas, a partir do sedimento, duas placas de SGC2. Em cada placa são colocadas 3 gotas em triângulo. Uma placa é incubada a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ em aerobiose, e a outra é incubada a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, temperatura ótima para crescimento dos fungos. O sedimento é guardado no frigorífico até ao fim do estudo para o caso de haver necessidade de um exame a fresco.

Microrganismos mais comuns: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Pneumocystis jiroveci*, *Nocardia spp.*, *Coccidioides immitis* e *Cryptococcus neoformans* (17,20).

3.3.5. Fezes

As infecções agudas do trato gastrointestinal estão entre as doenças infecciosas mais comuns em todo o mundo(39). Bactérias, toxinas, vírus e parasitas podem ser os responsáveis por esta patologia(40). A colheita deve ser realizada para um contentor estéril e enviada ao laboratório no dia da colheita.

Exame cultural: As amostras são semeadas nos meios MCK, HEKT e inoculado em caldo GN. Caso se trate de uma amostra proveniente do serviço de Pediatria ou que contenha sangue visível semeia-se também no meio SMAC.

A partir do caldo GN, após incubação, procede-se à passagem para os meios MCK e HEKT para efeitos de isolamento. Decorrido o tempo de incubação se houver suspeita de colónias de *Salmonella spp.* ou *Shigella spp.* no meio HEKT, realiza-se uma repicagem para o meio SALM. Se for solicitado a pesquisa de *Campylobacter spp.* a amostra é semeada diretamente no meio CAM. A incubação deste meio ocorre em microaerofília a uma temperatura de $\pm 42^{\circ}\text{C}$.

Para a pesquisa de *Yersinia enterocolítica* o meio utilizado é o YER, que deve ser incubado na estufa a uma temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ em aerobiose.

Exame parasitológico: Realiza-se este exame no caso de suspeita de Parasitose Intestinal. Permite identificar ovos de helmintas, cistos ou trofozoítos de protozoários e/ou vermes. É utilizada a Técnica de Ritchie que se baseia em centrifugação-sedimentação, o que faz com que os ovos e cistos de parasitas fiquem concentrados no fundo do tubo. Neste laboratório o kit utilizado é da Etiope Diagnostis.

Microrganismos mais comuns: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia spp.* e *Clostridium difficile* (17,39,40).

3.3.6. Zaragatoa Retal

Este produto destina-se à pesquisa de Enterobacteriáceas Resistentes aos Carbapenemos (ERC)(41).

Existem diferentes tipos de ERC, de acordo com a mutação genética que cada bactéria adquire, expressando assim diferentes tipos de sensibilidade antibiótica. Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), Nova Deli Metallo-betalactamase (NDM), Verona Integron-encoded Metallo-betalactamase (VIM), Oxacilinase tipo 48 (Oxa-48) e Imipenemase Metallo betalactamase (IMP) constituem as diferentes carbapenemases existentes(41,42).

Este rastreio é realizado a todos os doentes que cumpram os seguintes requisitos: transferência de outro hospital onde tenha permanecido mais de 48h; internamento hospitalar nos meses anteriores; presença de dispositivos invasivos; internamento em unidade de cuidados continuados ou lar nos 12 meses anteriores; colonização ou infeção prévia por EPC nos 12 meses anteriores e internados no Serviço de Medicina Intensiva.

Exame cultural: A zaragatoa retal é semeada por esgotamento do inóculo no meio CARB/OXA, com incubação a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. O crescimento de colónias com coloração rosa no meio CARB indica a possibilidade de E.Coli produtora de KPC. Colónias verdes no meio CARB indicam Enterobacteriales dos grupos KESC produtores de carbapenemos. No meio OXA, crescimento de colónias verdes é indicativo de K. pneumoniae produtora de OXA-48. São valorizadas todas as colónias que sejam Gram negativo.

3.3.7. Exsudados

Neste grupo de produtos, os mais frequentemente processados foram os exsudados nasais, vaginais e purulentos, a seguir descritos.

3.3.7.1 Exsudado Nasal

A análise do exsudado nasal permite a pesquisa de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente (MRSA). Estas bactérias possuem um conjunto de fatores de virulência, com importância clínica e de infeções associadas aos cuidados de saúde, e que contribuem para um aumento da morbidade e mortalidade em todo o mundo(43). O estudo e a sua identificação rápida permitem prevenir estas infeções e reduzir custos associados aos cuidados de saúde (23).

Exame cultural: As amostras do exsudado nasal são colhidas por zaragatoa, e transportadas em meio de transporte de Stuart até ao laboratório. De seguida são semeadas em meio MRSA por esgotamento em quadrantes. Posteriormente, incubadas numa estufa a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

3.3.7.2 Exsudado Vaginal

A pesquisa se *Streptococcus agalactiae* em grávidas no 3º trimestre é fundamental, uma vez que, este microrganismo pode causar sérias infeções nos recém-nascidos (44). A realização deste rastreio entre as 35 e 37 semanas de gestação permite, caso positivo, a implementação de uma terapêutica adequada para minimizar o risco de uma provável infeção no recém-nascido (44).

Tem sido demonstrado que a colheita de exsudado vaginal/anal, executada com a mesma zaragatoa, apresenta um índice de positividade duas vezes superior ao da coleta de exsudado apenas vaginal (44).

Exame cultural: a zaragatoa é inoculada no caldo TOODH-T, que é incubado a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por cerca de 24 horas. Posteriormente, faz-se a passagem do caldo para o meio STRB por técnica de esgotamento do inóculo, que é incubado novamente a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por cerca de 24 horas.

3.3.7.3 Exsudado Purulento

As amostras de exsudado purulento são provenientes de lesões de pé diabético, úlceras varicosas, úlceras de decúbito, fístulas, entre outros (20). Dada a possibilidade de haver uma contaminação com bactérias existentes na superfície da ferida é essencial que a colheita seja feita corretamente, a qual é realizada para seringas e frascos e transportada para o laboratório com a maior brevidade possível.

Exame cultural: É realizado um esfregaço corado pelo método de Gram para avaliar o tipo de microrganismos existentes. De seguida semeia-se, por esgotamento, nos meios PVX, CNA, MCK e inocula-se um caldo de Tioglicolato para enriquecimento e crescimento de microrganismos mais fastidiosos. Findo o período de incubação, o caldo é passado para os meios sólidos considerado adequados de acordo com as suspeitas dos agentes etiológicos presentes. Contudo, quando o volume das amostras é reduzido, inicia-se por enriquecer a amostra em caldo de Tioglicolato, e após as 24 h de incubação proceder à passagem para os meios PVX, CNA, MCK. Vai sendo avaliado o crescimento de colónias nas placas e procede-se com testes de identificação e TSA, sempre que o crescimento em placa é valorizado.

Microrganismos mais comuns: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* do grupo B, *Enterobacteriaceae*, microrganismos anaeróbicos, *B. fragilis* e *P. aeruginosa* (20).

3.3.8. Tecidos e Ossos

Estes produtos chegam ao laboratório quando há uma suspeita de osteomielite(20). Esta patologia ocorre quando existe um corte profundo, fraturas ou colocação de próteses e desta forma o agente infeccioso entra em contacto com o tecido ou osso (20).

Exame cultural: O produto é colocado em caldo de Tioglicolato e incubado durante 24h a $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Decorrido o tempo de incubação é passado para os meios sólidos MCK, CNA e PVX e realizado um esfregaço para coloração de Gram. Se houver crescimento, procede-se aos testes de identificação e ao antibiograma. Os tubos com caldo Tioglicolato são mantidos em estufa a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ em aerobiose até o fim dos estudos.

Microrganismos mais comuns: *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Actinomyces spp.*, *Brucella spp.* e *Legionella spp.*(20).

3.3.9. Líquidos das Cavidades Naturais

Os líquidos cavitários incluem os líquidos ascítico, pleural, pericárdico e sinovial são considerados líquidos estéreis, pelo que qualquer crescimento microbiano deve ser valorizado (20). De referir que o tempo entre a colheita e o processamento deve ser o menor possível para evitar deterioração da amostra.

Exame cultural: Os produtos são inoculados em caldo de Tioglicolato para enriquecimento, incubados em estufa a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ em aerobiose. Também são efetuados esfregaço para serem corados pelo método de Gram. Decorridas as 24h de incubação são realizadas as sementeiras em meios sólidos - COS, PVX e CPSE - a partir do caldo de Tioglicolato. Após 24h, é avaliado o crescimento em placa, sendo reincubadas caso o crescimento seja reduzido. Os frascos do produto com caldo Tioglicolato são mantidos na estufa a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ em aerobiose até o término dos estudos.

3.3.10. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é um fluido corporal estéril e considerada uma amostra de emergência médica(17)as patologias associadas são graves, das quais se destaca a meningite, e com elevadas taxas de mortalidade e morbidade (17). Assim, sempre que este produto chega ao laboratório, é imediatamente processado, para exame citoquímico, direto e cultural.

Exame Cultural: As amostras com volume superior a 1mL são centrifugadas (20min, 1500 a 3000 rpm) e a sementeira é realizada a partir do sedimento obtido. As amostras com volume inferior a 1mL são semeadas diretamente. Semeia-se nos meios PVX e COS colocando na superfície de cada meio sólido duas gotas em lados opostos da placa. Deixar secar e estriar por quadrantes apenas 1 das gotas. Realizar também esfregaço para coloração de Gram. Após 24

horas, pode ser avaliado o crescimento em placa. São reincubadas as amostras que apresentem um crescimento reduzido. A amostra restante deve ser guardada em estufa para eventuais exames necessários que sejam necessários serem realizados.

Microrganismos mais comuns: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do Grupo B (17).

3.3.11. Micobactérias

As micobactérias possuem uma parede celular é rica em lípidos e ácidos micólicos o que lhes confere características específicas, e a classificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Das várias espécies existentes, o *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da maioria dos casos de tuberculose humana(17)(45). Estima-se que cerca de um terço da população mundial está atualmente infetada com esta bactéria(20).

Chegam ao laboratório diversos tipos de amostras para estudo micobacteriológico, entre os quais: urinas, LCR, expetoração, aspirados brônquicos, fezes, suco gástrico, sangue e líquidos de cavitários.

O método *gold standard* para o diagnóstico de micobactérias é o exame cultural em meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ), que por se tratar de bactérias de crescimento fastidiosa, o período de incubação pode ser longo. Atualmente têm sido implementadas metodologias automatizadas e técnicas de biologia molecular, permitindo obter resultados mais rapidamente. No entanto os resultados só poderão ser efetivamente validados junto do resultado do exame direto e cultural, para que seja diferenciada a forma ativa da inativa da tuberculose.

O processamento das amostras inclui os processos de homogeneização e descontaminação, para posterior inoculação nos meios de MGIT e LJ.

Alguns produtos, como expetoração mais densa, devem ser tratados com o mucolítico N-acetil-L-cisteína (NALC), enquanto outros, com abundante volume, devem ser centrifugados antes de manipulados. Adiciona-se 10mL de amostra em um tubo de Falcon de fundo cónico + 10 mL de descontaminante. A descontaminação tem como objetivo eliminar bactérias do produto, normalmente pertencentes à flora comensal do local de origem da amostra, que possam vir a impedir o crescimento das micobactérias. É utilizado o kit BBL™ MycoPrep™, que possui hidróxido de sódio e NALC na composição, tornando a descontaminação mais

eficaz e menos tóxica para as micobactérias. O tempo de incubação da amostra com este reagente é entre 15 e 20 minutos. Ressalta-se que para um produto como o LCR, considerado estéril, a descontaminação é dispensada. Após descontaminação, adiciona-se tampão fosfato até perfazer 50mL para parar a ação dos dois reagentes, além de neutralizar o pH. Centrifuga-se o tubo falcon durante 15 minutos a 4000 rpm. Decanta-se o sobrenadante. Com o sedimento, realizam-se 2 esfregaços para coloração de Auramina. Ressuspende-se o sedimento com 2 a 3mL de tampão e verifica-se se o pH está entre 6,8 e 7,1. Antes de inocular em MGIT, o tubo passa por uma descontaminação com PANTA™, uma mistura de antibióticos (anfotericina B, ácido nalidíxico, polimixina B, trimetoprima, azlocilina). Adiciona-se 0,5mL de amostra no MGIT e 2 a 3 gotas no meio LJ. Os tubos com meio LJ são incubados por volta de 5 dias a 35°C, inclinados numa posição horizontal e com a tampa frouxa, para que a inoculação da amostra ocorra em todo o meio. Estes tubos ficam a incubar a uma temperatura de 37°C durante 8 semanas, sendo observados semanalmente desse existe crescimento. O MGIT™ é um tubo indicador de crescimento de micobactérias suplementado com caldo Middlebrook modificado. Este utiliza o equipamento BACTEC™ MGIT™, que possui detetores para emissão de fluorescência pelo tubo quando há positividade para a presença de micobactérias. A incubação ocorre a 37°C, e os tubos são monitorizados pelo sistema do equipamento para o aumento de fluorescência. Os frascos de cultura que não apresentarem aumento da fluorescência durante 42 dias são considerados negativos e removidos do equipamento BACTEC™ MGIT™.

3.4. Controlo de Qualidade

No laboratório de microbiologia é fundamental apresentar resultados fidedignos e rigorosos, que cumpram os requisitos de qualidade exigidos e possam assim ter utilidade clínica(46,47). De forma a garantir tal desempenho, a implementação de um sistema de gestão de qualidade. Neste âmbito, um dos requisitos é a realização do controlo de qualidade analítico.

O laboratório realiza, com frequência, dois tipos de controlo, o controlo de qualidade interno (CQI) e a avaliação externa da qualidade (AEQ)(47). Estes controlos permitem monitorizar todos os processos analíticos e o seu desempenho através da exatidão e precisão dos resultados obtidos (46). Desta forma, é possível evidenciar a conformidade na execução dos exames laboratoriais(47).

3.4.1. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O CQI avalia e monitoriza a reprodutibilidade (precisão) e a aproximação ao valor real (exatidão), permitindo assim, verificar a calibração dos sistemas analíticos, monitorizar o desempenho dos procedimentos técnicos, reagentes, calibradores, meios de cultura, equipamentos, e indicar o momento de se aplicarem ações corretivas quando surge uma não conformidade(46,47). Cada setor possui o seu próprio CQI. Os controlos são disponibilizados pelas casas comerciais e apresentam uma concentração dos analitos conhecida que permitem saber se método está a fornecer resultados adequados na amplitude da sua linearidade e acima de tudo testar os valores na margem de decisão clínica. As amostras de controlo são processadas nos analisadores (identificadas com códigos de barras definidos pelo SPC) e os resultados transmitidos automaticamente e em tempo real para o sistema informático.

A programação dos valores do CQI e respetivos desvios, tanto nos analisadores automáticos como no sistema informático (Clinidata®), neste serviço fica a cargo dos Médicos Patologistas Clínicos. No serviço, o programa informático Clinidata® permite, no módulo de controlo de qualidade interno, não só a programação de valores de controlo como a representação em gráficos de controlo de *Levey-Jennings* e programação de regras de *Westgard*, com a respetiva emissão de alarmes para cada analito segundo as regras de *Westgard*.

3.4.2. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

A AEQ é um controlo interlaboratorial que permite ao laboratório assegurar que os seus resultados se aproximam o mais possível com os valores reais (exatidão)(46,47). Os laboratórios participantes analisam e reportam os resultados das amostras que lhes são enviadas pelas Entidades Promotoras, responsáveis pelos programas de controlo. Para avaliação dos resultados, os participantes são separados por grupos de metodologias/equipamentos iguais, é determinado o resultado qualitativo ou a média de consenso para cada grupo e calculado o respetivo desvio-padrão. Por último, é feita uma avaliação dos resultados de cada laboratório e emitido o relatório de desempenho. A avaliação dos relatórios de desempenho é da responsabilidade do SPC. No caso dos Point-of-care inscritos em programas de AEQ a avaliação do relatório de desempenho é também remetida ao Serviço onde se encontram os equipamentos.

O laboratório de microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do CHTS está inserido em vários programas de AEQ como o *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UK

NEQAS) e programas pertencentes ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

4. Conclusão

O Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública fornece uma abrangência teórica e teórico-prática sobre as diversas áreas de atuação das ACSP, assim como permite o desenvolvimento de competências laboratoriais. O estágio curricular que decorreu no 2º ano, permitiu aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos no 1º ano curricular, assim como adquirir novas aptidões e competências. Paralelamente, o estágio no CHTS foi muito enriquecedor a nível pessoal.

Por se tratar de um hospital de referência com um grande afluxo de amostras pude participar ativamente na rotina de trabalho do laboratório de microbiologia, contactar com vários produtos biológicos e vários fluxos de processamento de acordo com a natureza dos produtos. Tive oportunidade de acompanhar por observação a validação médica e compreender a informação observada e valorizada do crescimento observado nas placas após as sementeiras assim como a sua interpretação, identificação de microrganismos e interpretação de antibiogramas. Foi ainda possível, com os Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) adquirir capacidade de organização num laboratório clínico, coordenação de atividades e uma maior compreensão e destreza na execução das técnicas laboratoriais.

Com este estágio pude vivenciar a realidade de estar no mundo de trabalho e de integrar uma equipa multidisciplinar e desenvolver competências interrelacionais fundamentais para o exercício profissional, enquadrado no mercado de trabalho em constante evolução. Pelas razões anteriormente elencadas, podemos considerar que este estágio contribuiu positivamente para uma formação académica atual e avançada. Foi sem dúvida uma experiência única, a todos os níveis, que me fez sentir mais confiante e preparada para o meu futuro profissional.

Capítulo II – Estudo de Caso: A relação dos valores de procalcitonina com os microrganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS em 2022

1. Introdução

A procalcitonina tem demonstrado potencial como ferramenta de diagnóstico para a deteção precoce e avaliação de infeções bacterianas devido à sua capacidade de resposta a toxinas bacterianas e a respostas inflamatórias sistémicas (48). No entanto, apesar da sua utilidade clínica, a relação específica entre os valores de procalcitonina e os microrganismos detetados em hemoculturas positivas continua a ser uma área de investigação ativa na comunidade médica(49).

Historicamente, a hemocultura tem sido considerada o *gold standard* para a identificação dos microrganismos causadores das infeções na corrente sanguínea (50). No entanto, este método de diagnóstico é demorado o que contribui para atrasar a antibioterapia adequada e consequentemente, ao agravamento do estado de saúde do doente(51).

Na procura de biomarcadores que possam ajudar na deteção precoce no desenvolvimento de septicemia, face às suas características tem sido estudada a possibilidade da procalcitonina ser um biomarcador com valor preditivo(48).

Uma das principais vantagens da procalcitonina como biomarcador é a sua capacidade de distinguir entre infeções bacterianas e infeções virais. Nos casos de infeção bacteriana, os níveis de procalcitonina tendem a elevar-se significativamente, enquanto em infeções virais, os níveis permanecem baixos ou levemente aumentados. Isso é particularmente útil na diferenciação entre pneumonia bacteriana e viral, ajudando os médicos a determinar a abordagem adequada de tratamento(48).

Além do diagnóstico, a procalcitonina também pode ser utilizada para controlar a evolução da infeção e a resposta ao tratamento. Se os níveis de procalcitonina caírem rapidamente ao longo do tempo, isso pode indicar uma resposta adequada ao tratamento antibiótico. Por outro lado, se os níveis permanecerem altos ou continuarem a aumentar, pode ser um sinal de uma infeção persistente ou progressão da doença(52).

No entanto, é importante ressaltar que a interpretação dos níveis de procalcitonina deve ser feita em conjunto com a avaliação clínica do paciente, levando em consideração outros fatores e sintomas(53). A procalcitonina não deve ser usada como o único critério para tomar decisões clínicas, mas sim como uma ferramenta complementar(53).

Alguns estudos sugerem que certos microrganismos podem induzir uma resposta inflamatória mais intensa, resultando em níveis mais elevados de procalcitonina. Por exemplo, infecções causadas por bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, que podem estar associadas a níveis mais altos de procalcitonina. No entanto, outros microrganismos, como *Escherichia coli*, podem não estimular uma resposta inflamatória tão acentuada, resultando em níveis de procalcitonina mais baixos(54).

Além disso, a presença de microrganismos fúngicos também pode influenciar os níveis de procalcitonina e as infecções fúngicas podem levar a uma resposta inflamatória sistêmica, mas os níveis de procalcitonina geralmente não aumentam tão significativamente quanto nas infecções bacterianas(54).

A procalcitonina pode fornecer informações complementares sobre a gravidade da infecção e a resposta do organismo, mas não é capaz de identificar o microrganismo específico envolvido. Por sua vez, os níveis de procalcitonina podem variar dependendo da virulência do microrganismo, da resposta imunológica do hospedeiro e de outros fatores individuais(55).

Por fim, a procalcitonina tem-se posicionado como um bom marcador para avaliação e acompanhamento de pacientes com suspeita de processo infeccioso(56).

Apesar dos progressos neste campo, a correlação específica entre os valores de procalcitonina e os microrganismos identificados em hemoculturas positivas ainda continua a ser uma área de investigação ativa (52).

1.1. Infecções da Corrente Sanguínea

As infecções da corrente sanguínea constituem um desafio para toda a comunidade médica sendo um fator significativo de morbidade e mortalidade junto da população. Os indivíduos com uma infecção sanguínea apresentam uma ampla gama de sintomas graves que vão desde à presença de febre inexplicável a inflamação generalizada grave, disfunção orgânica e condições potencialmente fatais, como a septicemia e o choque séptico (57).

Não existe atualmente uma definição padrão universalmente aceita para a infecção da corrente sanguínea(58). Por conseguinte, qualquer descrição de infecção da corrente sanguínea deve incluir o requisito de uma hemocultura positiva confirmada laboratorialmente para um ou mais microrganismos. No entanto, é importante notar que uma hemocultura positiva isolada não indica automaticamente uma infecção da corrente sanguínea em curso (58).

Uma hemocultura positiva pode resultar de três cenários distintos: 1) contaminação, 2) quando não existe uma infecção clínica aparente, ou 3) quando existe efetivamente uma infecção clínica. A contaminação refere-se à presença de um microrganismo contaminante durante a colheita ou manuseamento da amostra e que não estava a circular ativamente na corrente sanguínea do doente (59). A bacteriemia e a fungemia denotam a presença de bactérias ou fungos viáveis na corrente sanguínea, e as hemoculturas só são consideradas positivas depois de eliminadas todas as possibilidades de contaminação (60). Os microrganismos normalmente encontrados na pele são frequentemente responsáveis pela contaminação de hemoculturas, o que torna a definição de bacteriemia ou da infecção da corrente sanguínea mais complexa. Embora os termos infecção da corrente sanguínea e bacteriemia sejam muitas vezes utilizados indistintamente, há duas distinções fundamentais que devem ser assinaladas: 1) A infecção da corrente sanguínea abrange uma gama mais vasta, incorporando causas bacterianas e fúngicas; e 2) A infecção da corrente sanguínea significa que a cultura de sangue positiva está associada a manifestações clínicas de infecção (59,60).

A maioria dos casos de bacteriemia está ligada a infecções, mas há casos de bacteriemia transitória após procedimentos que envolvem superfícies ou locais não esterilizados do corpo, como o trato gastrointestinal superior e inferior ou o trato respiratório superior, sem qualquer infecção associada (60).

As infecções da corrente sanguínea têm normalmente origem em infecções localizadas em diferentes partes do corpo, como o trato urogenital, o sistema respiratório, a pele e os tecidos moles ou o trato gastrointestinal. Dependendo da capacidade da resposta imunológica do doente, as infecções graves podem evoluir para septicemia.

1.2. Classificação das Infecções da Corrente Sanguínea

As alterações nas práticas de cuidados de saúde, a demografia da população e o impacto da globalização transformaram significativamente a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea adquiridas na comunidade(61). Além disso, os microrganismos resistentes aos antibióticos, em especial o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e as *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado surgiram como causas significativas de infecções da corrente sanguínea de origem comunitária. Verifica-se também um aumento substancial das infecções da correntes sanguínea adquiridas no hospital e associadas aos cuidados de saúde (62,63). Estas infecções resultam em hospitalização

prolongada, aumento das despesas com cuidados de saúde e ineficácia do tratamento, o que leva a um aumento das taxas de mortalidade (64), muitas vezes associadas à antibioterapia empírica (65).

Outro obstáculo significativo decorre da transformação substancial da prestação de cuidados de saúde observada nos últimos tempos, em que intervenções médicas complexas, como a hemodiálise domiciliária e os antibióticos parenterais, são agora administradas em ambientes comunitários(66). Na Figura 15 é possível observar a pirâmide de diagnóstico para hemoculturas positivas, sejam no contexto hospitalar ou em contexto comunitário.

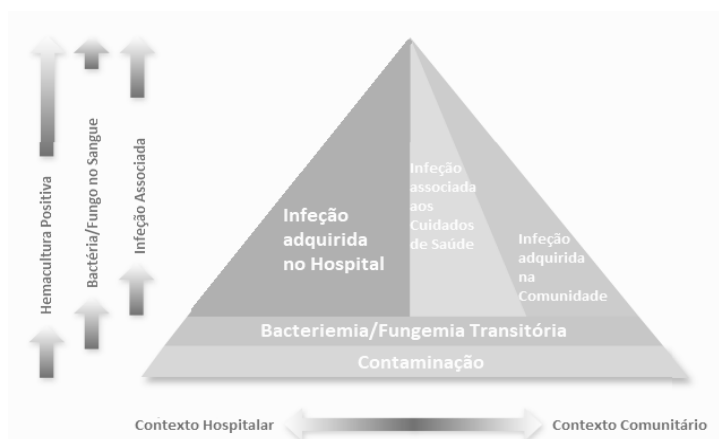


Figura 15- Pirâmide de diagnóstico de uma hemocultura (66)

As infeções adquiridas no hospital são definidas como aquelas em que uma cultura positiva é identificada pela primeira vez 2 ou mais dias ($\geq 48h$) após a admissão hospitalar ou no prazo de 2 dias ($< 48h$) após a alta hospitalar (67). O aumento dos cuidados especializados fora do hospital levou a uma subclassificação adicional das infeções de início na comunidade em associadas aos cuidados de saúde - envolvendo doentes com contacto prévio contínuo ou significativo com os cuidados de saúde - e adquiridas na comunidade - englobando todos os outros casos (68).

1.3. Principais Microrganismos Isolados em Hemoculturas e Significado

Os microrganismos isolados em hemoculturas são uma área importante de estudo na microbiologia. Assim, a identificação e o estudo desses microrganismos são essenciais para compreender a sua diversidade, função, patogenicidade e aplicação em diferentes setores(69). A ampla distribuição das bactérias está relacionada com a sua diversidade metabólica e capacidade de ocupar uma variedade de nichos ecológicos(70). Na saúde humana, são várias

as bactérias pertencentes ao microbioma com potencialidade de provocar patologias infecciosas. Assim:

- A *Escherichia coli* é uma bactéria encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais, sendo uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa(71). Embora a maioria das *E. coli* sejam inofensivas e desempenhem um papel benéfico no sistema digestivo, algumas podem causar doenças. A *Escherichia coli* pode ser transmitida através de alimentos contaminados, água ou contato com indivíduos ou animais infetados(71). No campo da microbiologia, a *E. coli* é amplamente utilizada como organismo modelo para pesquisas e os seus mecanismos genéticos e celulares são bem estudados e contribuíram significativamente para a compreensão da biologia molecular e da genética(71).

Adicionalmente, a *Escherichia coli* pode produzir toxinas e causar vários tipos de infecções, incluindo infecções do sistema urinário, infecções gastrointestinais e infecções respiratórias. A gravidade dessas infecções pode variar de leve a grave, dependendo também do sistema imunológico do indivíduo. Nesse sentido, uma das variantes patogênicas mais conhecidas de *E. coli* é a O157:H7, que está fortemente associada a doenças transmitidas por alimentos, podendo causar sintomas como diarreia (muitas vezes com sangue), dor abdominal e vômitos(72).

- Por sua vez, o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva que normalmente habita a pele e as mucosas humanas. Pode causar infecções de pele, infecções do trato respiratório e infecções hospitalares graves. Por outro lado, é um tipo de bactéria comumente encontrada na pele e nas passagens nasais de humanos. É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e faz parte da microbiologia normal de muitos indivíduos(73). No entanto, também pode causar uma ampla gama de infecções se entrar no corpo através de feridas na pele ou outras vias e esta bactéria é conhecida pela sua capacidade de produzir várias toxinas e enzimas que contribuem para a sua patogenicidade (71,73).

O *Staphylococcus aureus* pode causar uma variedade de infecções, desde infecções cutâneas menores, como furúnculos, abscessos e impetigo, até condições mais graves e com risco de vida, como pneumonia, infecções da corrente sanguínea (bacteremia) e infecções do local cirúrgico. Por outro lado, é também uma causa comum de infecções hospitalares. O *S. aureus* pode ser transmitido por contacto direto com indivíduos infetados ou por contacto com objetos ou superfícies contaminadas(73). Também pode ser

transmitido por gotículas respiratórias. Assim, as boas práticas de higiene, como lavagem regular das mãos e tratamento adequado de feridas, podem ajudar a prevenir infecções por *S. aureus*(71,73).

Além de ser um agente patogénico, o *S. aureus* também é objeto de pesquisa científica, pelo que tem sido extensivamente estudado para se entender os seus fatores de virulência, mecanismos de resistência a antibióticos e interações com o sistema imunológico humano. Desse modo, este conhecimento é crucial para o desenvolvimento de tratamentos eficazes e medidas preventivas contra infecções por *S. aureus*(73).

- Por outro lado, a *Salmonella* é uma bactéria transmitida por alimentos contaminados e podem causar intoxicação alimentar, caracterizada por sintomas gastrointestinais. É um género de bactéria gram-negativa e é conhecida por causar infecções alimentares em humanos e animais. A *Salmonella* é composta por várias espécies, incluindo a *Salmonella* entérica, que é a mais comum e relevante para a saúde humana(74). A bactéria pode invadir o trato gastrointestinal e causar gastroenterite, caracterizada por sintomas como diarreia, vômitos, febre e dores abdominais. Além da gastroenterite, a *Salmonella* também pode causar outras formas de infeção, como a febre tifoide. A febre tifoide é uma doença mais grave, transmitida através da ingestão de água ou alimentos contaminados com *Salmonella enterica serovar Typhi*(75).

A prevenção da infeção por *Salmonella* envolve medidas como a prática de higiene adequada, incluindo lavagem frequente das mãos, manipulação correta e armazenamento seguro dos alimentos, além de cozinhar os alimentos adequadamente para destruir a bactéria(76). A maioria das infeções por *Salmonella* é autolimitada e não requer tratamento específico, além de repouso e hidratação adequada. No entanto, em casos graves ou em pessoas com risco aumentado de complicações, como crianças pequenas, idosos ou indivíduos imunodeprimidos, o tratamento com antibióticos pode ser necessário(76,77).

- Por outro lado, o *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria Gram positivo que causa pneumonia, meningite e outras infeções respiratórias, principalmente em crianças e idosos. A variedade limitada de vacinas disponíveis e o aumento de bactérias resistentes a antibióticos significam que novos tratamentos são necessários. O género *Streptococcus* é altamente diverso, sendo o *Streptococcus pneumoniae* o representante mais importante

em termos de saúde pública, pois tem potencial para causar doenças graves como meningite e pneumonia(77).

A transmissão do pneumococo ocorre geralmente através de gotículas respiratórias, de pessoa para pessoa. A bactéria pode-se espalhar facilmente em ambientes fechados, como residências, escolas ou ambientes de saúde(77). Além de causar infecções, o *Streptococcus pneumoniae* também pode colonizar o trato respiratório superior de forma assintomática. Isso significa que a bactéria pode habitar o nariz e a garganta sem causar sintomas. Estima-se que uma parte significativa da população carregue o pneumococo no seu sistema respiratório em algum momento da sua vida(78).

Quando as técnicas de colheita de sangue não são corretas, os organismos comensais presentes na pele podem levar à contaminação da amostra. Este facto resulta frequentemente em hemoculturas falso-positivas, envolvendo microrganismos como *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Bacillus spp.* (excluindo *Bacillus anthracis*), *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Cutibacterium acnes*(78).

Entre as infecções por fungos, a espécie *Aspergillus* é a mais prevalente. No entanto, na ausência de imunossupressão significativa, representa frequentemente uma contaminação ambiental. Por conseguinte, o passo inicial consiste em excluir a contaminação. Posteriormente, torna-se crucial determinar se a bacteriemia/fungemia está de facto associada a uma infecção da corrente sanguínea ou não(78).

Idealmente, estariam disponíveis definições amplamente aceites de bacteriemia/fungemia e de infecção da corrente sanguínea, mas não é esse o caso. Em vez disso, é necessária uma avaliação abrangente que inclua fatores laboratoriais e clínicos(78). Ao avaliar uma hemocultura positiva, deve-se levar em consideração os fatores seguintes:

- 1) Os microrganismos identificados: A deteção de um ou mais microrganismos numa amostra de hemocultura obtida e tratada aseticamente indica, na maioria dos casos, uma infecção da corrente sanguínea. Como já foi referido, vários microrganismos comensais da pele podem dar origem a hemoculturas falsamente positivas. Em doentes imunocompetentes que não têm dispositivos médicos internos, como cateteres intravasculares, as ocorrências de bacteriemia com estes microrganismos são raras. No entanto, em algumas ocasiões, podem conduzir a infecções da corrente sanguínea de início comunitário. Por outro lado, o isolamento de uma levedura ou fungo numa cultura de sangue indica consistentemente fungemia e infecção da corrente sanguínea(79).

- 2) O momento e a quantidade de culturas positivas têm importância: Um volume suficiente de amostra de sangue é o fator mais importante na identificação laboratorial de microrganismos na corrente sanguínea. De acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, recomenda-se a recolha de quatro frascos, cada um contendo 10 ml de sangue (por exemplo, dois conjuntos de hemoculturas, sendo cada conjunto composto por um frasco aeróbio e um anaeróbio, totalizando 40 ml de sangue) para aumentar a probabilidade de deteção de 90-95% das bacteriemias na primeira hemocultura. A adição de um terceiro conjunto de hemoculturas aumenta ainda mais a taxa de deteção para 95-99%(80). Um estudo realizado por *Collazos-Blanco et al.* em 2019, envolvendo 4 000 episódios de infeções da corrente sanguínea, revelou que, sem a implementação de um terceiro conjunto de hemoculturas, cerca de 8% das infeções da corrente sanguínea não teriam sido detetadas. Outros estudos propuseram que poderá ser necessário maior volume de sangue (81). *Lee et al.* realizaram um estudo no qual descobriram que, em casos de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, a primeira hemocultura detetou as infeções em 60% dos casos. Para episódios de infeção polimicrobiana, apenas 67% dos microrganismos foram identificados na primeira hemocultura, mas, em geral, 99% foram detetados na terceira hemocultura(82).
- 3) Bacteriemia transitória: também conhecida como bacteriemia de baixo grau, refere-se à presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea sem uma infeção da corrente sanguínea associada. A bacteriemia transitória ocorre normalmente devido à manipulação de superfícies mucosas contaminadas ou colonizadas, tais como procedimentos dentários, incluindo a escovagem dos dentes(83), procedimentos gastrointestinais endoscópicos e procedimentos respiratórios invasivos(84). Aproximadamente 20% dos procedimentos de biopsia prostática por agulha transretal estão associados a bacteriemia transitória, alguns dos quais conduzem ao desenvolvimento de infeções da corrente sanguínea(59).
- 4) Os critérios clínicos implicam a definição de infeção da corrente sanguínea como uma cultura de sangue positiva acompanhada de uma indicação clara do foco de infeção. Este foco pode ser identificado clínica e/ou microbiologicamente através do isolamento da mesma espécie a partir de aspirados de tecidos profundos ou de amostras adquiridas em locais habitualmente estéreis. Em certos casos, estabelecer o foco da infeção pode

ser um desafio, necessitando de parâmetros adicionais para diferenciar uma cultura de sangue positiva como contaminação ou não. Embora uma contagem elevada de leucócitos juntamente com febre, seja frequentemente mencionada como um critério significativo, mas confiar apenas neste indicador revela-se um indicador insuficiente de infeção da corrente sanguínea (85). No âmbito dos critérios de identificação infeções da corrente sanguínea é igualmente importante considerar a terapia antibiótica em curso, pois pode indicar um tratamento insuficiente e não uma infeção definitiva da corrente sanguínea(86).

2. Objetivo

Este estudo teve como objetivo explorar a importância da procalcitonina como biomarcador preditivo de septicemia e a relação com os microrganismos isolados em hemoculturas, em doentes do Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa, durante o ano de 2022.

3. Materiais e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Realizou-se um estudo observacional analítico retrospectivo, realizado com registos de resultados clínico-laboratoriais de episódios ocorridos com doentes do CHTS durante o ano 2022, com suspeita clínica de infeções da corrente sanguínea.

3.2. Amostra

Foi definido como unidade amostral cada episódio de hemocultura positiva e com doseamento de procalcitonina no máximo de intervalo de 12 horas entre recolha de amostras, em doentes que recorreram ao CHTS no ano 2022. Foi definido como critério de exclusão os registos dos resultados com uma diferença de mais de 12 horas entre a recolha de hemoculturas e a análise de procalcitonina. Este critério ajudará a eliminar potenciais enviesamentos causados por atrasos na colheita de amostras e garantirá que ambos os resultados dos testes estão estreitamente relacionados temporalmente.

3.3. Procedimentos

A recolha de dados analíticos deste estudo foi garantida previamente todas as fases do processo analítico das variáveis em estudo, foram uniformizadas seguindo protocolos instituídos, nomeadamente relativo à avaliação dos níveis de procalcitonina utilizando procedimentos laboratoriais padronizados.

Para interpretar os níveis de procalcitonina como preditores de risco de desenvolvimento de septicemia, utilizaram-se os pontos de corte identificados na Tabela 1.

Tabela 1- Interpretação dos resultados de PCT para avaliação de risco para septicemia grave e/ou choque séptico (87)

Concentração de PCT (ng/mL)	Interpretação
<0,05 ng/mL	Risco baixo de septicemia grave e/ou choque séptico
≥0,5 a ≤2,0 ng/mL	Risco moderado de progressão para septicemia grave e/ou choque séptico
>2,0 ng/mL	Risco elevado de septicemia grave e/ou choque séptico

O estudo utiliza dados secundários recolhidos durante a prática clínica de rotina no CHTS. Fontes internas, como registos de saúde eletrónicos ou bases de dados laboratoriais, serão acedidas para obter dados relevantes para o estudo. Foi recolhida a informação no sistema CliniData relativa aos valores de cada episódio, assim como os dados para também caracterizar os doentes referentes aos episódios quanto à idade e sexo.

3.4. Análise Estatística dos Dados

Será realizada estatística descritiva e inferencial. A estatística descritiva foi utilizada para resumir as características da amostra em estudo. Foram calculadas medidas como a média, a mediana, o desvio padrão, a frequência absoluta e relativa para uma caracterização dos dados. Para avaliar a: i) relação entre os tipos de microrganismos e o sexo, foi realizado o qui-quadrado; ii) associação entre os níveis de procalcitonina e os resultados da hemocultura, foi realizada uma análise de variância (ANOVA). Escolheu-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), indicando um nível de confiança de 95% para significância estatística. A análise de dados foi realizada utilizando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

3.5. Considerações Éticas

A extração de dados envolveu a consulta da base de dados do CHTS para todos os registos das variáveis elegíveis neste estudo referentes ao ano de 2022. De forma a manter a confidencialidade e cumprir as diretrizes éticas os dados utilizados serão mantidos anónimos. O presente estudo seguiu políticas rigorosas de confidencialidade e privacidade dos dados para proteger os direitos e o anonimato dos sujeitos. Este projeto foi aprovado pela comissão de ética do CHTS (Anexo 8).

4. Resultados

Os registos de hemoculturas positivas e com valores de procalcitonina totalizaram 336 episódios, o que significa que alguns doentes tiveram mais do que 1 episódio, no total 282 doentes envolvidos. A idade média dos doentes é de $65,79 \pm 21,74$ anos, variando entre <1 ano e 95 anos de idade, sendo a idade mais frequente 84 anos e a mediana das idades é 70 anos. A maioria das amostras pertence a doentes do sexo feminino (54,61%, n=154).

Os valores de procalcitonina variaram entre 0,1 e 295,71 ng/mL, observando-se um valor médio de $15,35 \pm 34,16$ ng/mL. Observou-se ainda que a mediana foi 2,045 ng/mL e a moda <0,1 ng/mL.

Em média, os valores de procalcitonina foi bastante superior nas mulheres ($21,71 \pm 45,82$ ng/mL) comparativamente aos homens ($9,95 \pm 17,98$ ng/mL). Por aplicação do teste t-Student para amostras independentes com um nível de significância de 5%, verificaram-se diferenças significativas nesta variável entre os dois sexos (Tabela 2).

Tabela 2- Valores médios de procalcitonina em função do sexo

	Procalcitonina (ng/mL)		t	g.l	p
	Média	Desvio-padrão			
F	21,71	45,824	3,179	334	,002
M	9,95	17,977			
Total	15,35	34,162			

Legenda: gl – graus de liberdade; p – probabilidade de significância.

Associando os valores de procalcitonina aos níveis de risco, verificou-se existir risco elevado de septicemia grave num elevado número de episódios (48,81%, n=164), seguido de risco

moderado de progressão para septicemia grave (25,89%, n=87) e risco baixo de septicemia grave (25,30%, n=85) (Tabela 3).

Tabela 3-Frequência absoluta e relativa da procalcitonina em função dos níveis de risco

Procalcitonina	Frequência	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Risco baixo de septicemia grave e/ou choque séptico (<0,05 ng/mL)	85	25,30
Risco moderado de progressão para septicemia grave e/ou choque séptico ($\geq 0,5$ a $\leq 2,0$ ng/mL)	87	25,89
Risco elevado de septicemia grave e/ou choque séptico (>2,0 ng/mL)	164	48,81
Total	336	100,00

Pretendeu-se verificar ainda se havia associação entre o sexo e o tipo de microrganismo presente nas hemoculturas. Recorrendo ao teste de qui-quadrado com um nível de significância de 5%, obteve-se uma probabilidade de significância $p=0,114$, com nível de graus de liberdade 58, o que nos permite afirmar que não há associação entre o sexo e o tipo de microrganismos presentes nas hemoculturas.

Pela análise dos valores médios de procalcitonina constantes na Tabela 4, verifica-se que os valores são bastante heterogêneos. Neste seguimento, foi-se verificar a relação entre os valores de procalcitonina tendo em conta o tipo de microrganismos presentes nas hemoculturas. Para um nível de significância de 5%, recorreu-se ao teste Anova One-way tendo-se obtido um valor de $p=0,154$, pelo que se conclui não existirem diferenças significativas.

Tabela 4- Comparação dos valores médios de procalcitonina considerando o tipo de microrganismos presentes nas hemoculturas

Microrganismos isolados	FR (%)	Média (ng/mL)	Microrganismos isolados	FR (%)	Média (ng/mL)
<i>Bacillus spp</i>	0,31	84,54	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0,61	6,71
<i>Enterococcus faecalis (D)</i>	1,53	63,33	<i>Klebsiella ozaenae</i>	0,31	6,25
<i>Citrobacter freundii</i>	0,31	61,52	<i>Candida glabrata</i>	1,23	5,9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,61	57,41	<i>Hafnia alvei</i>	0,31	5,53
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,61	52,8	<i>Morganella morganii spp morga.</i>	0,61	4,33
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,92	47,72	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,31	4,04
<i>Kocuria kristinae</i>	0,31	45,3	<i>Haemophilus influenza</i>	0,61	3,74
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3,37	43,82	<i>Streptococcus group C</i>	0,31	3,39
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	0,31	37,88	Flora polimicrobiana	3,07	2,62
<i>Achromobacter denitrificans</i>	0,31	35,32	<i>Staphylococcus Coagulase Negativo</i>	34,36	6,14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,15	33,09	<i>Klebsiella spp</i>	0,92	2,27
<i>Escherichia coli</i>	14,11	30,79	<i>Streptococcus suis I</i>	0,31	2,26
<i>Granulicatella adiacens</i>	0,61	24,15	<i>Streptococcus spp</i>	1,23	1,94
<i>Citrobacter braakii</i>	0,31	24,01	<i>Serratia marcescens</i>	0,61	1,2
<i>Enterobacter spp</i>	0,61	23,73	<i>Pantoea spp</i>	0,31	1,19
<i>Streptococcus anginosus</i>	1,23	23,52	<i>Streptoc salivarius ssp saliva</i>	0,31	1,01
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,31	21,84	<i>Streptococcus mitis/Streptococcus oralis</i>	0,92	0,92
<i>Candida albicans</i>	1,84	19,88	<i>Turicella otitidis</i>	0,31	0,88
<i>Raoultella planticola</i>	0,31	18,7	<i>Actinomyces meyeri</i>	0,31	0,79
<i>Enterococcus faecium</i>	1,23	17,15	<i>Trichosporon asahii</i>	0,31	0,53
<i>Klebsie.pneumon.ssp pneumoniae</i>	5,21	16,46	<i>Micrococcus luteus</i>	0,31	0,48
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,31	15,55	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	0,31	0,43
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,31	14,23	<i>Streptococcus gallolyticus ssp pasteurianus</i>	0,31	0,24
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,35	10,84	<i>Cutibacterium acnes</i>	0,31	0,21
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,92	9,44	<i>Bacteroides splanchnicus</i>	0,31	0,1
<i>Salmonella group</i>	0,61	9,05	<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,31	0,1
			<i>Proteus mirabilis</i>	0,92	8,06

Legenda: FR- Frequência Relativa

Seguidamente fomos explorar eventuais diferenças nos níveis médios de procalcitonina entre os dois sexos para todos os microrganismos encontrados nas hemoculturas (Tabela 5

Tabela 5- Comparação dos valores médios de procalcitonina em função do sexo

Microorganismos Isolados	Procalcitonina			
	Frequência Absoluta		Média (ng/mL)	
	F	M	F	M
<i>Achromobacter denitrificans</i>	0	1	0	35,32
<i>Actinomyces meyeri</i>	1	0	0,79	0
<i>Bacillus spp</i>	1	0	84,54	0
<i>Bacteroides splanchnicus</i>	0	1	0	0,1
<i>Candida albicans</i>	0	6	0	19,88
<i>Candida glabrata</i>	1	3	7,37	5,41
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	0	1	0	0,43
<i>Citrobacter braakii</i>	0	1	0	24,01
<i>Citrobacter freundii</i>	0	1	0	61,52
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	0	4,04	0
<i>Cutibacterium acnes</i>	0	1	0	0,21
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	101,82	3,77
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	0	6,71
<i>Enterobacter spp</i>	1	1	47,12	0,33
<i>Enterococcus faecalis (D)</i>	3	2	98,9	9,97
<i>Enterococcus faecium</i>	3	1	14,86	24,01
<i>Escherichia coli</i>	25	21	39,32	21,02
<i>Flora polimicrobiana</i>	5	5	1,59	3,64
<i>Granulicatella adiacens</i>	1	1	47,86	0,43
<i>Haemophilus influenza</i>	1	1	1,59	6,96
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	5,53	0
<i>Klebsiella spp</i>	10	13	21,66	15,64
<i>Kocuria kristinae</i>	1	0	45,3	0
<i>Micrococcus luteus</i>	0	1	0	0,48
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	1	0	0,1
<i>Morganella morganii spp morga.</i>	1	1	1,42	7,23
<i>Pantoea spp</i>	0	1	0	1,19
<i>Proteus mirabilis</i>	3	0	8,06	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	5	119,32	1,07
<i>Raoultella planticola</i>	1	0	18,7	0
<i>Salmonella group</i>	1	1	1,54	16,56
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	1,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	25	19,71	6,33
<i>Staphylococcus Coagulase Negativo</i>	59	53	10,35	1,93
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	21,84	0
<i>Streptococcus spp</i>	10	25	32,85	20,51
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0	0,53	0
<i>Turicella otitidis</i>	1	0	0,88	0

Verificou-se maior frequência dos seguintes microrganismos *Enterococcus faecalis* (D) (n=3, nas mulheres e n=2, nos homens), *Enterococcus faecium* (n=3, nas mulheres e n=1, nos homens), *Escherichia coli* (n=25, nas mulheres e n=21, nos homens), *Klebsiella spp* (n=10, nas mulheres e n=13, nos homens), *Proteus mirabilis* (n=3, nas mulheres e n=0, nos homens), *Pseudomonas aeruginosa* (n=2, nas mulheres e n=5, nos homens), *Staphylococcus aureus* (n=12, nas mulheres e n=25, nos homens), *Staphylococcus* Coagulase Negativo (n=59, nas mulheres e n=53, nos homens) e *Streptococcus spp* (n=10, nas mulheres e n=25, nos homens). No grupo de *Streptococcus spp*, a espécie mais frequentemente isolada foi *Streptococcus pneumoniae* (n=2, nas mulheres e n=9, nos homens) e *Streptococcus pyogenes* (n=1, nas mulheres e n=2, nos homens). No caso do *Streptococcus pneumoniae*, observou-se um valor médio de procalcitonina de 119,32 ng/mL para o sexo feminino e 30,52 ng/mL para o sexo masculino. Enquanto que para o *Streptococcus pyogenes* a diferença desta variável entre os sexos é mais equilibrada, observando-se 45,3 ng/mL para o sexo feminino e 48,93 ng/mL para o sexo masculino. Em todos os casos, está subjacente um risco elevado de septicemia grave.

Por fim, pretendeu-se avaliar a variação do valor médio da procalcitonina em função de grupos de microrganismos, morfologia e reação tintorial ao Gram (Tabela 6). Verificou-se que a maioria dos microrganismos isolados são bactérias (93,56%), pertencentes ao grupo de bacilos Gram negativo (31,29%) e cocos Gram positivo (60,74%).

Apesar da quantidade de hemoculturas positivas para fungos ser superior à soma dos bacilos Gram positivo e cocos Gram negativo, o valor médio de procalcitonina para fungos é inferior (3,37% e 1,53%, respetivamente).

A existência de hemoculturas positivas para flora polimicrobiana pode ser explicada através da contaminação existente durante a colheita.

Tabela 6- Valores médios de procalcitonina em função da tipologia de microrganismos

	Tipologia de microrganismos nas hemoculturas		Procalcitonina
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)	Média (ng/mL)
Bacilo Gram negativo	102	31,29	16,96
Bacilo Gram positivo	3	0,92	29,59
Cocos Gram negativo	2	0,61	17,71
Cocos Gram positivo	198	60,74	17,62
Fungos	11	3,37	8,77
Flora polimicrobiana	10	3,07	2,62

5. Discussão

O principal objetivo do presente estudo foi a avaliação da existência de uma relação direta entre os valores de procalcitonina e os microrganismos presentes nas hemoculturas positivas entre os utentes do Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa (CHTS) no ano de 2022.

Através dos resultados obtidos foi possível observar que o nível médio de Procalcitonina foi significativamente mais elevado nas mulheres em comparação com os homens. Isto sugere uma potencial diferença baseada no género nos níveis de procalcitonina utilizada para identificar hemoculturas positivas. Este resultado corrobora o resultado obtido por *Bakhtiari* colaboradores(88), cujo objetivo foi analisar a precisão dos níveis de procalcitonina para o diagnóstico de septicemia com cultura positiva em doentes críticos com trauma. Além dos resultados demonstram que a procalcitonina é um bom preditor da septicemia, ficou também patente que os seus níveis médios eram mais elevados nas culturas de indivíduos do género feminino(88).

Também no estudo realizado por *Sadeghi* e colaboradores (89), com o objetivo de comparar os valores de diagnóstico da procalcitonina com a proteína C-reativa, taxa de sedimentação de eritrócitos, contagem de glóbulos brancos e hemocultura em doentes com infeções bacterianas do sangue(89). Os resultados demonstraram uma diferença significativa em função do sexo observada em relação à positividade dos resultados do teste procalcitonina sendo que a maioria dos níveis de procalcitonina foi observada em doentes do sexo feminino(89).

Tal pode ser explicado pelo facto de o sistema imunitário dos indivíduos do sexo feminino responderem de forma diferente à presença de infeção do que os indivíduos do sexo

masculino. Por exemplo, as mulheres podem produzir mais procalcitonina em resposta à infecção(90). De facto, a procalcitonina aparece como sendo um biomarcador bastante útil para o diagnóstico e a monitorização de doentes com operações ginecológicas e infeções pós-parto tendo em conta que nos últimos anos a taxa de sépsis materna está aumentou e a infeção grave é uma complicação ginecológica significativa(91).

No entanto, alguns estudos já realizados mostram resultados contrários. Por exemplo, *Angele* e colaboradores (92)descreveram níveis significativamente elevados de procalcitonina na septicemia em doentes do sexo masculino, em comparação com doentes do sexo feminino(93). O referido estudo sugere que aparecem níveis mais elevados de procalcitonina no sexo masculino uma vez que as hormonas sexuais masculinas, ou seja, os androgénios, demonstraram ser supressoras das respostas imunitárias mediadas por células(92). Em contraste, as hormonas sexuais femininas exibem efeitos protetores que podem contribuir para as vantagens naturais das mulheres em condições sépticas. Ou seja, como as hormonas constituem um fator protetor nas mulheres e a procalcitonina surge associada à sépsis, os homens vão possuir níveis mais elevados (92).

A análise realizada não encontrou associação significativa entre o sexo e o tipo de microrganismos presente nas hemoculturas positivas. Por conseguinte, o estudo sugere que o sexo não desempenha um papel significativo na determinação do tipo de microrganismos presentes nas hemoculturas positivas.

O valor de p obtido (0,154) é superior a 0,05, indicando que não há evidência estatística suficiente para rejeitar a hipótese de que não existem diferenças significativas nos níveis de procalcitonina entre os diferentes tipos de microrganismos isolados de hemoculturas.

Além disso, é mencionado que as médias são bastante diferentes entre os grupos, mas a análise estatística leva em conta não apenas as médias, mas também a variabilidade dos dados e o tamanho da amostra em cada grupo. No caso em estudo, como os números de episódios de cada tipo de microrganismo isolado da hemocultura são bastante diferentes, e com valores variáveis de procalcitonina, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). Assim, com base na análise dos dados, não é possível conformar que existe uma relação direta entre o nível de procalcitonina e o tipo de microrganismos presentes nas hemoculturas. O que significa, que a procalcitonina não poderá ser diretamente relacionada aos agentes etiológicos. Contudo, no estudo desenvolvido por Oussalah e colaboradores (93) , e após dividirem as suas amostras em hemocultura negativa, bacteriemia

por bactérias Gram positivo, bacteriemia por bactérias Gram negativo, fungos e potenciais contaminantes encontrados na hemocultura, chegaram a conclusão de que as concentrações mais elevadas de procalcitonina foi observada em doentes cujo agente etiológico pertencia ao grupo de bactérias Gram negativo. Com limiares ótimos que variam entre $\leq 0,4$ e $\leq 0,75$ ng/mL, a procalcitonina teve uma elevada precisão de diagnóstico para excluir todas as categorias de agentes patogénicos com os seguintes valores preditivos negativos: Bactérias Gram negativo (98,9%) (incluindo enterobactérias (99,2%), bacilos Gram negativo não fermentadores (99,7%) e bactérias anaeróbias (99,9%), bactérias Gram positivo (98,4%) e fungos (99,6%) (93)

Como limitação referimos a ausência de dados clínicos que nos permitissem avaliar a especificidade e sensibilidade da procalcitonina como parâmetro preditor de risco de septicemia, segundo os pontos de corte para os diferentes níveis de risco.

6. Conclusão

Atendendo que, neste estudo, os valores de procalcitonina variaram em função do sexo e do tipo de microrganismos isolados de hemoculturas positivas, podemos considerar que este parâmetro analítico poderá ter valor preditivo para avaliação do risco de septicemia, tal como descrito na literatura, e eventualmente, ser usado na monitorização de infeções da corrente sanguínea.

No entanto, considerando as limitações deste estudo, a sua utilização neste domínio deve ser complementada com outras informações clínicas e resultados de testes laboratoriais para fornecer uma avaliação abrangente do estado de saúde dos doentes. A compreensão das limitações e das potenciais aplicações da procalcitonina em diferentes cenários clínicos abrirá caminho para abordagens mais eficazes e personalizadas na gestão de infeções e da septicemia.

7. Referências Bibliográficas

1. Rhoads DD, Sintchenko V, Rauch CA, Pantanowitz L. Clinical microbiology informatics. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Oct 1;27(4):1025–47.
2. Mascart G, Martiny D, Miendje Y, Tummers G, Mahadeb B, Vandenberg O, et al. Automatisation en bactériologie: Quel avenir ? Un exemple concret dans le cadre d'une consolidation de laboratoires universitaires. *Ann Biol Clin (Paris).* 2018 Jul 1;76(4):365–72.
3. BD BACTEC™ [Internet]. [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/blood-culture/bactec>
4. Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern G v. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul 1;41(7):3119–25.
5. Spaargaren J, van Boven CPA, Voorn GP. Effectiveness of Resins in Neutralizing Antibiotic Activities in Bactec Plus Aerobic/F Culture Medium. Vol. 36, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* 1998.
6. Wilson ML, Mirrett S, Meredith FT, Weinstein MP, Scotto V, Reller LB. Controlled clinical comparison of BACTEC Plus Anaerobic/F to Standard Anaerobic/F as the anaerobic companion bottle to Plus Aerobic/F medium for culturing blood from adults. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):983–9.
7. Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):816–21.
8. Ravikumar KL, Shenoy S. Time to Positivity of Microorganisms with BACTEC 9050--An 18-month Study Among Children of 28 Days to 60 Months in an South Indian Tertiary Hospital Pan India Distribution of Pneumococcal Serotypes View project [Internet]. 2011. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/228335201>
9. BD BACTEC™ MGIT™ 960 e 320 [Internet]. [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/mycobiology-testing/bactec-mgit-960-and-320>
10. BD BBL™ MycoPrep™ [Internet]. [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/mycobiology-testing/bbl-mgit-mycobacterial-growth-indicator-tubes>
11. VITEK® 2 [Internet]. [cited 2023 Jan 25]. Available from: https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2#vitek-2-with-cassettes.jpg_0_1
12. Pincus DH. MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK ® 2 SYSTEM [Internet]. Available from: www.pda.org/bookstore
13. Aerospray® Gram Slide Stainer [Internet]. [cited 2023 Jan 26]. Available from: <https://www.aerospraystaining.com/gram.html>

14. Aerospray® TB Slide Stainer [Internet]. [cited 2023 Jan 26]. Available from: <https://www.aerospraystaining.com/tb.html#>
15. Sistemas GeneXpert® [Internet]. [cited 2023 Jan 26]. Available from: <https://www.cepheid.com/pt/systems/GeneXpert-Family-of-Systems/GeneXpert-System>
16. Buitrago J. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico. 3rd ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2010.
17. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology. 8th ed. Elsevier; 2016. 1–932 p.
18. Levinson W. Review of medical microbiology and immunology. 10th ed. McGraw-Hill Education ; 2008.
19. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg. 26th ed. AMGH Editora Ltda.; 2014. 1–872 p.
20. Forbes BA, Sahm DF, Bailey WR, Weissfeld AS, Scott EG. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld A s., editors. Elsevier Mosby; 2007. 1–1031 p.
21. Mackenzie DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. J clin Path. 1962;15:563–5.
22. CLEARVIEW™ PBP2a SA CULTURE COLONY TEST [Internet]. [cited 2023 Feb 7]. Available from: <https://www.globalpointofcare.abbott/en/product-details/clearview-pbp2a.html>
23. Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Jun;52(2):113–22.
24. O.K.N.V.I. RESIST-5 [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.corisbio.com/products/oknvi-resist-5>
25. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. Vol. 66, Clinical Infectious Diseases. Oxford University Press; 2018. p. 1290–7.
26. OSOM® Strep A Test [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://sekiusdiagnostics.com/product/osom-strep-a-test/>
27. Bayot ML, Bragg BN. Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>
28. Meios de cultura para AST [Internet]. [cited 2023 Sep 12]. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-para-ast>
29. Likhachev I V., Kraeva LA, Samoilova AA, Rogacheva E V., Kaftyreva LA, Egorova SA, et al. Approbation of russian test strips for antimicrobial susceptibility testing of microorganisms by gradient diffusion method (E-test). Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2020 Sep 16;65(9):557–61.
30. Ferreira J. Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. [Coimbra]: Universidade de Coimbra; 2019.
31. ETEST® [Internet]. [cited 2023 Sep 12]. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/etestr>

32. Bioline™ ROTA/ADENO [Internet]. [cited 2023 Feb 7]. Available from: <https://www.globalpointofcare.abbott/en/product-details/bioline-rotadeno-ag-rapid-kit.html>
33. Zboromyrska Y, Cueto López M, Alonso-Tarrés C, Sánchez-Hellín V. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario [Internet]. 2019. Available from: www.seimc.org
34. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. Amer Soc For; 2009.
35. Cercenado E, Rafael M, Moreno C, Carlos J, Díaz R, Carlos Rodríguez J, et al. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares [Internet]. Available from: www.seimc.org
36. Guembe M, Martín-Rabadán P, Cruces R, Pérez Granda MJ, Bouza E. Sonicating multi-lumen sliced catheter tips after the roll-plate technique improves the detection of catheter colonization in adults. *J Microbiol Methods*. 2016 Mar;122:20–2.
37. Bell T, O'Grady NP. Prevention of Central Line–Associated Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2017 Sep;31(3):551–9.
38. Mizgerd JP. Acute Lower Respiratory Tract Infection. *New England Journal of Medicine*. 2008 Feb 14;358(7):716–27.
39. Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Aug;27(7):406–11.
40. Adler PM. Stool examination: Culture versus gram stain. *Ann Emerg Med*. 1986 Mar;15(3):337–41.
41. Prevenção da transmissão de enterobactérias resistentes aos carbapenemos em hospitais de cuidados de agudos [Internet]. [cited 2023 Sep 15]. Available from: <https://www.dgs.pt/programa-de-prevencao-e-controlo-de-infecoes-e-de-resistencia-aos-antimicrobianos/destaques/recomendacao-prevencao-da-transmissao-de-enterobacteriaceas-resistentes-aos-carbapenemos-em-hospitais-de-cuidados-de-agudos.aspx>
42. CDC. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Update–CRE Toolkit. 2015.
43. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Oct;31(4).
44. Borger IL, d'Oliveira REC, Castro ACD de, Mondino SSB de. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2005 Oct;27(10).
45. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2018 Jun;26(6):555–6.
46. Badrick T. Integrating quality control and external quality assurance. Vol. 95, *Clinical Biochemistry*. Elsevier Inc.; 2021. p. 15–27.
47. Barcelos LF, Aquino JL. *Tratado de Análises Clínicas*. 1st ed. Atheneu; 2018. 1–840 p.

48. Machado Melo JF, De Almeida DX, Gomes Barros D, Nascimento Da Silva R, Azevedo Dos Santos S, Margot Pereira Vasquez Z, et al. Fatores que influenciam na qualidade das amostras de sangue coletadas para o exame de hemocultura: uma revisão integrativa. *Peer Review*. 2023 Jun 14;5(12):302–19.
49. Hamade B, Huang DT. Procalcitonin. *Crit Care Clin*. 2020 Jan;36(1):23–40.
50. Araujo MRE de. Hemoculturas: Recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. 2012.
51. Ferreira EB, Araújo MEF, Cabral MRL, Neres LLFG. Principais bactérias causadoras de sepse: sepse em unidade de terapia intensiva. *Research, Society and Development*. 2021 Nov 13;10(14):e540101422455.
52. Lacroix J. What tests can help diagnose and estimate the severity of sepsis? *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Jul 1;83(4):297–8.
53. Azevedo JRA de, Torres OJM, Czezczko NG, Tuon FF, Nassif PAN, Souza GD de. Procalcitonina como biomarcador de prognóstico da sepse grave e choque séptico. *Rev Col Bras Cir*. 2012 Dec;39(6):456–61.
54. Massaro KSR. Procalcitonina (PCT) como indicador de infecção grave em adultos neutropênicos febris. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2007.
55. Chorão RMA de S. UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE BIOMARCADORES: APLICAÇÃO DA PROCALCITONINA NA PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE [Internet]. 2008 [cited 2023 Sep 18]. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.6/759>
56. Augusto Á, Calatayud P, Carrillo Esper R. Procalcitonin as marker of infectious processes in surgery. Current concepts [Internet]. Vol. 35. 2013. Available from: www.medigraphic.org.mxEsteartículopuedeserconsultadoenversióncompletaen:<http://www.medigraphic.com/cirujanogeneral>www.medigraphic.org.mx
57. Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013 Jun;19(6):501–9.
58. Bonilha DQ, Correia LM, Monaghan M, Lenz L, Santos M, Libera E Della. Prospective study of bacteremia rate after elective band ligation and sclerotherapy with cyanoacrylate for esophageal varices in patients with advanced liver disease. *Arq Gastroenterol*. 2011 Dec;48(4):248–51.
59. Levy MJ, Norton ID, Clain JE, Enders FB, Gleeson F, Limburg PJ, et al. Prospective Study of Bacteremia and Complications With EUS FNA of Rectal and Perirectal Lesions. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2007 Jun;5(6):684–9.
60. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia Associated With Toothbrushing and Dental Extraction. *Circulation*. 2008 Jun 17;117(24):3118–25.
61. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988 Jun;16(3):128–40.

62. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *J Clin Microbiol*. 2011 May;49(5):1866–71.
63. Pittet D. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1994 May 25;271(20):1598–601.
64. Orsi GB, Stefano L Di, Noah N. Hospital-Acquired, Laboratory-Confirmed Bloodstream Infection: Increased Hospital Stay and Direct Costs. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002 Apr 2;23(4):190–7.
65. De Bus L, Coessens G, Boelens J, Claeys G, Decruyenaere J, Depuydt P. Microbial etiology and antimicrobial resistance in healthcare-associated versus community-acquired and hospital-acquired bloodstream infection in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Dec;77(4):341–5.
66. Lenz R, Leal JR, Church DL, Gregson DB, Ross T, Laupland KB. The distinct category of healthcare associated bloodstream infections. *BMC Infect Dis*. 2012 Dec 9;12(1):85.
67. Morin CA, Hadler JL. Population-Based Incidence and Characteristics of Community-Onset *Staphylococcus aureus* Infections with Bacteremia in 4 Metropolitan Connecticut Areas, 1998. *J Infect Dis*. 2001 Oct 15;184(8):1029–34.
68. Friedman ND. Health Care-Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Ann Intern Med*. 2002 Nov 19;137(10):791.
69. Martins F, Vitorino J, Abreu A. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE MICRORGANISMOS ISOLADOS EM URINAS Na Região do Vale do Sousa e Tâmega [Internet]. 2010. Available from: www.actamedicaportuguesa.com
70. Mercia D, Reis D, Nielsen TB, Fachineto JM, Lisiane Tissot-Squalli M. BACTERÍÓFAGOS E FAGOTERAPIA: UMA REVISÃO [Internet]. 2018 [cited 2023 Sep 18]. Available from: <https://publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/salaconhecimento/article/view/10041>
71. Oliveira WV de, Santos WS dos, Gomes BS, Lima JL da C. Etiologia e perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados de hemoculturas no Hospital das Clínicas da UFPE no período de janeiro a dezembro de 2014. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2019;51(1).
72. Rani A, Ravindran VB, Surapaneni A, Mantri N, Ball AS. Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. *Int J Food Microbiol*. 2021 Jul;349:109233.
73. Escrhuela-Vidal F, Kaasch AJ, Von Cube M, Rieg S, Kern W V., Seifert H, et al. Impact of adherence to individual quality-of-care indicators on the prognosis of bloodstream infection due to *Staphylococcus aureus*: a prospective observational multicentre cohort. *Clinical Microbiology and Infection*. 2023 Apr;29(4):498–505.
74. Sheng L, Wang H, Harris LJ, Wang L. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in citrus storage waxes or on lemons held under common commercial storage conditions. *Food Microbiol*. 2023 Oct;115:104339.




75. Caldeira Gonçalves R, Faleiro JH, Guimarães MN, Santos D, Solange), De Carvalho A, et al. MICRO-ORGANISMOS EMERGENTES DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO DA LITERATURA EMERGING MICROORGANISMS OF THE IMPORTANCE IN FOOD: A REVIEW. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.* 2016.
76. Shinohara NKS, Barros VB de, Jimenez SMC, Machado E de CL, Dutra RAF, Lima Filho JL de. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Cien Saude Colet.* 2008 Oct;13(5):1675–83.
77. Willian de Alencar Pereira E, Fontes VC, da Fonseca Amorim EA, de Miranda R de CM, Carvalho RC, de Sousa EM, et al. Antimicrobial effect of quercetin against Streptococcus pneumoniae. *Microb Pathog.* 2023 Jul;180:106119.
78. Hall KK, Lyman JA. Updated Review of Blood Culture Contamination. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Oct;19(4):788–802.
79. Chu VH, Woods CW, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, et al. Emergence of Coagulase-Negative Staphylococci as a Cause of Native Valve Endocarditis. *Clinical Infectious Diseases.* 2008 Jan 15;46(2):232–42.
80. Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA. The Clinical Significance of Positive Blood Cultures: A Comprehensive Analysis of 500 Episodes of Bacteremia and Fungemia in Adults. I. Laboratory and Epidemiologic Observations. *Clinical Infectious Diseases.* 1983 Jan 1;5(1):35–53.
81. Collazos-Blanco A, Pérez-García F, Sánchez-Carrillo C, de Egea V, Muñoz P, Bouza E. Estimation of missed bloodstream infections without the third blood culture set: a retrospective observational single-centre study. *Clinical Microbiology and Infection.* 2019 Apr;25(4):469–73.
82. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures Are Needed? *J Clin Microbiol.* 2007 Nov;45(11):3546–8.
83. DuVall NB, Fisher TD, Hensley D, Hancock RH, Vandewalle KS. The comparative efficacy of 0.12% chlorhexidine and amoxicillin to reduce the incidence and magnitude of bacteremia during third molar extractions: a prospective, blind, randomized clinical trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013 Jun;115(6):752–63.
84. Janssen J, König K, Knop-Hammad V, Johanns W, Greiner L. Frequency of bacteremia after linear EUS of the upper GI tract with and without FNA. *Gastrointest Endosc.* 2004 Mar;59(3):339–44.
85. Beekmann SE, Diekema DJ, Doern G V. Determining the Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Blood Cultures. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005 Jun 21;26(6):559–66.
86. Bates DW. Contaminant Blood Cultures and Resource Utilization. *JAMA.* 1991 Jan 16;265(3):365.
87. Access PCT Assay [Internet]. 2022 [cited 2023 Sep 30]. Available from: <https://www.beckmancoulter.com/products/immunoassay/access-pct>

88. Bakhtiar A, Haider Kazmi SJ, Asghar MS, Khurshaidi MN, Mazhar S, Khan NA, et al. Accuracy of Procalcitonin Levels for Diagnosis of Culture-Positive Sepsis in Critically Ill Trauma Patients: A Retrospective Analysis. *Cureus*. 2021 Jan 29;
89. Nasimfar A, Sadeghi E, Karamyyar M, Manesh L. Comparison of serum procalcitonin level with erythrocytes sedimentation rate, C-reactive protein, white blood cell count, and blood culture in the diagnosis of bacterial infections in patients hospitalized in Motahhari hospital of Urmia (2016). *J Adv Pharm Technol Res*. 2018;9(4):147.
90. Yunus I, Fasih A, Wang Y. The use of procalcitonin in the determination of severity of sepsis, patient outcomes and infection characteristics. *PLoS One*. 2018 Nov 14;13(11):e0206527.
91. Tujula B, Kokki H, Räsänen J, Kokki M. Procalcitonin; a feasible biomarker for severe bacterial infections in Obstetrics and Gynecology? *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018 May 14;97(5):505–6.
92. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis. *Virulence*. 2014 Jan 5;5(1):12–9.
93. Oussalah A, Ferrand J, Filhine-Tresarrieu P, Aissa N, Aimone-Gastin I, Namour F, et al. Diagnostic Accuracy of Procalcitonin for Predicting Blood Culture Results in Patients With Suspected Bloodstream Infection. *Medicine*. 2015 Nov;94(44):e1774.
94. BD BACTEC™ Peds Plus™ medium [Internet]. [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://www.bd.com/en-ca/offerings/capabilities/microbiology-solutions/blood-culture/bd-bactec-blood-culture-media/bd-bactec-peds-plus-medium>
95. BD BACTEC™ Lytic Anaerobic medium [Internet]. [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://www.bd.com/en-ca/offerings/capabilities/microbiology-solutions/blood-culture/bd-bactec-blood-culture-media/bd-bactec-lytic-anaerobic-medium>
96. BD BACTEC™ Plus Aerobic medium [Internet]. [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://www.bd.com/en-ca/offerings/capabilities/microbiology-solutions/blood-culture/bd-bactec-blood-culture-media/bd-bactec-plus-aerobic-medium>
97. Xpert® MTB/RIF Ultra [Internet]. [cited 2023 Jan 31]. Available from: <https://www.cepheid.com/pt/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-MTB-RIF-Ultra>
98. Xpert® MRSA NxG [Internet]. [cited 2023 Jan 31]. Available from: <https://www.cepheid.com/pt/tests/Healthcare-Associated-Infections/Xpert-MRSA-NxG>
99. Xpert® C. difficile BT [Internet]. [cited 2023 Jan 31]. Available from: <https://www.cepheid.com/pt/tests/Healthcare-Associated-Infections/Xpert-C.-difficile-BT>
100. Xpert® Carba-R [Internet]. [cited 2023 Jan 31]. Available from: <https://www.cepheid.com/pt/tests/Healthcare-Associated-Infections/Xpert-Carba-R>
101. Xpert® Xpress CoV-2 plus [Internet]. [cited 2023 Jan 31]. Available from: <https://www.cepheid.com/pt/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-Xpress-Cov-2-plus>

102. Xpert® Xpress CoV-2/Flu/RSV plus [Internet]. [cited 2023 Jan 31]. Available from: <https://www.cepheid.com/pt/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert%20Xpress%20CoV-2-Flu-RSV%20plus>
103. Gama BIPLACA [Internet]. [cited 2023 Feb 1]. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/gama-biplaca>
104. Gama chromID® [Internet]. [cited 2023 Feb 1]. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/gama-chromidr>
105. Meios de cultura convencionais [Internet]. [cited 2023 Feb 1]. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-convencionais>
106. C. difficile Ag (GDH) MonlabTest® [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: C. difficile Ag (GDH) MonlabTest®

Anexos

Anexo 1: Tipos de garrafas de hemoculturas e as suas principais características (3,6,94–96)

Tipo de garrafa		Características
BD BACTEC™ Plus Aerobic medium		<ul style="list-style-type: none"> - Capaz de suportar o crescimento de microrganismos aeróbios -Meio enriquecido com caseína de soja - Atmosfera aeróbia enriquecida com CO₂ - Contém resinas para neutralização antibiótica
BD BACTEC™ Lytic Anaerobic medium		<ul style="list-style-type: none"> - Usada para aumentar a deteção e recuperação de microrganismos anaeróbios - Contém um detergente (saponina) para lisar os glóbulos vermelhos e brancos presentes na atmosfera, libertando todos os microrganismos intracelulares
BD BACTEC™ Peds Plus™ medium		<ul style="list-style-type: none"> -Usada para amostras pediátricas com pequeno volume -Contém resinas para neutralização antibiótica

Anexo 2

Tabela A-Tipos de cartas usadas no Vitek®2 (11,12)

Tipo de Carta	Nome	Microrganismo alvo
Identificação (ID)	GN	Gram negativos fermentadores e não-fermentadores
	GP	Gram positivos
	NH	Bactérias do género <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i> e outras bactérias gram negativas fastidiosas
	YST/YS08	Leveduras patogénicas (fungos)
	ANC	Bactérias anaeróbias e corineformes
Testes sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)	N355	Enterobactérias (Bacilos gram negativos; oxidase negativa)
	N373	Enterobactérias não fermentadoras (Bacilos gram negativos; oxidase positiva)
	P586	Enterococos (Cocos gram positivos; catalase negativa)
	P648	Estafilococos (Cocos gram positivos; catalase positiva)
	PST03	Estreptococos (Cocos gram positivos; catalase negativa)

Tabela B- Suspensões usadas no Vitek®2 (11,12)

Suspensões usadas no VITEK		
Intervalos de Turbidez McFarland	Microrganismo alvo	Tipo de Carta de ID
0.55-0.65	Gram negativos e positivos	GP; GN
1.8-2.2	Fungos	YST/YS08
2.8-3.3	<i>Neisseria spp.</i> ; <i>Haemophilus spp.</i> ; Hacek; Anaeróbios; <i>Corynebacterium spp.</i>	NH; ANC

Anexo 3: Testes do GeneXpert® usados no CHTS (15,97–102)

Nome teste Xpert®	Descrição do teste	Duração do teste
Xpert® Xpress CoV-2/Flu/RSV plus	Deteção e diferenciação dos vírus SARS-CoV-2, gripe A, gripe B e vírus respiratório sincicial (VRS), com a adição de um 3º gene-alvo para SARS-CoV-2	≈36 minutos
Xpert® Xpress CoV-2 plus	Deteção rápida do vírus SARS-CoV-2, com três genes-alvo	≈20 minutos
Xpert® MRSA NxG	Deteção de MRSA para testes de vigilância ativa	≈45 minutos
Xpert® Carba-R	Deteção e diferenciação de KPC, NDM, VIM, IMP e OXA-48	≈50 minutos
Xpert® C. difficile BT	Deteção de infecção por Clostridioides difficile com resultados independentes de toxina binária e diferenciação da estirpe 027	≈45 minutos
Xpert® MTB/RIF Ultra	Deteção do complexo Mycobacterium tuberculosis e de mutações associadas à resistência à rifampicina	≈80 minutos

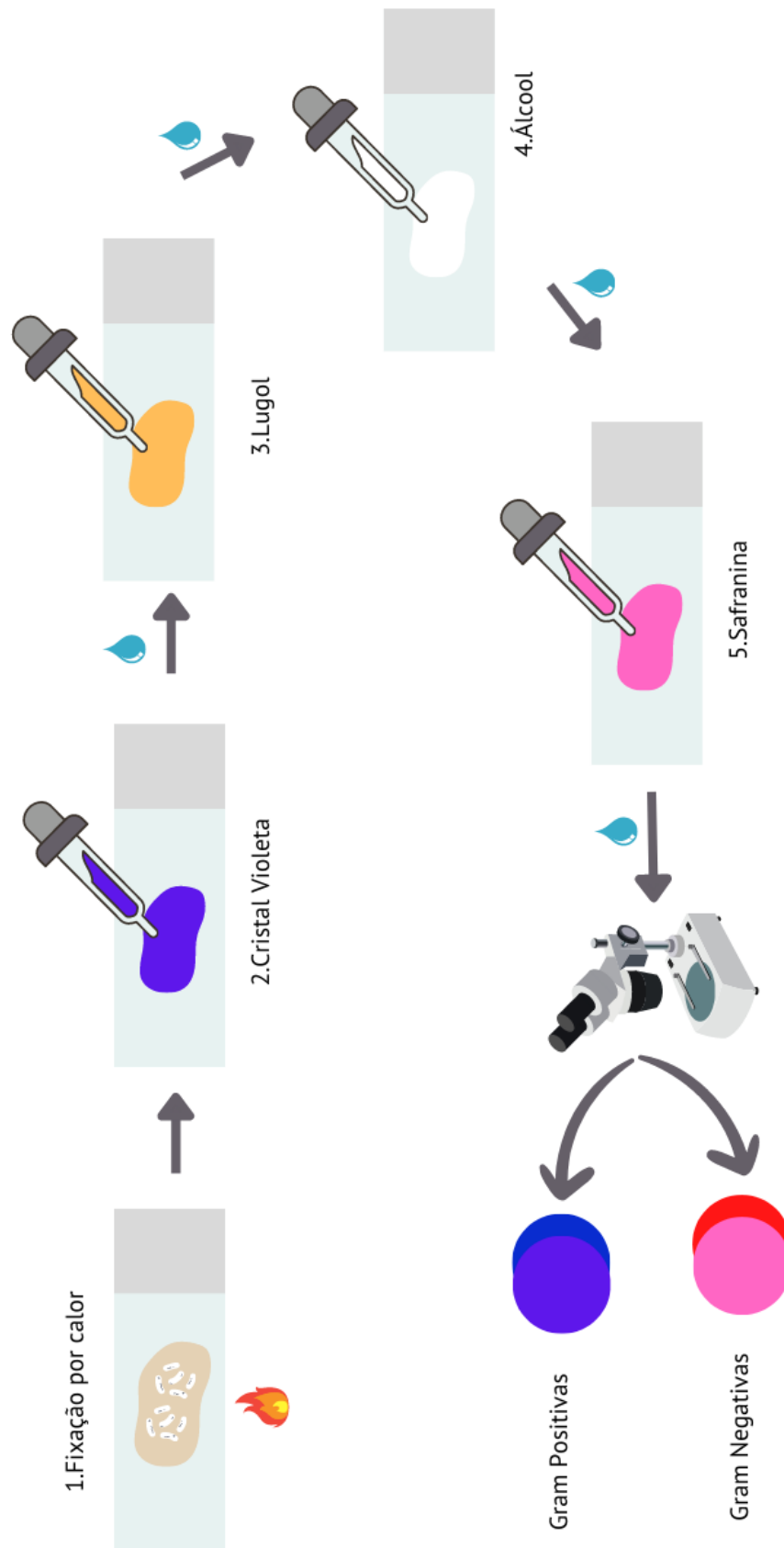
Anexo 4: Meios de cultura usados no CHTS (17,18,20,103–105)

Meio	Características do meio
Gelose de MacConkey com Sorbitol (SMAC)	Meio usado para pesquisa e identificação de <i>E.coli</i> enteremorrágica
Gelose de Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro (CNA)	Meio seletivo que permite o desenvolvimento de bactérias Gram (+)
Gelose Mueller–Hinton + 5% de sangue de cavalo + 20 mg/l β-NAD (MHF)	Meio recomendado para a realização de TSA; Permite o crescimento de bactérias exigentes
Gelose Mueller–Hinton (MHE)	Meio não seletivo recomendado para a realização de TSA; Permite o crescimento de bactérias não exigentes
Gelose CLED (CLED)	Meio não seletivo que permite o isolamento de microrganismos urinários. Os germes lactose (+) originam colónias amarelas por acidificação do meio. Os germes não fermentadores originam colónias verdes, azuis ou incolores. As características do meio permitem limitar a invasão da gelose por <i>Proteus spp.</i>
Gelose chromID® CPS® Elite (CPSE)	Meio diferencial e semi-quantitativo de microrganismos na urina. A elevada concentração de agar inibe a contaminação da placa pelo swarming do <i>Proteus spp.</i> A identificação das bactérias baseia-se no seguinte princípio: <i>E. coli</i> : coloração espontânea num tom vermelho a carmim de estirpes produtoras; <i>Enterococcus</i> : coloração turquesa de estirpe; KESC: coloração azul a verde; <i>Proteaeae</i> : coloração castanho difuso.
Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)	Meio não seletivo utilizado para o isolamento de bactérias exigentes.
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Meio não seletivo permite o isolamento e crescimento de bactérias exigentes. A adição de sangue desfibrinado permite a visualização da ação hemolítica de algumas bactérias (β,α,γ). A hemólise total (β) caracteriza-se por uma zona clara à volta da colónia ou por baixo da colónia. A hemólise parcial (α) caracteriza-se uma coloração esverdeada à volta da colónia. A ausência de hemólise (γ) é a ausência de lise das hemácias à volta da colónia.
Gelose de MacConkey (MCK)	Meio seletivo para bactérias Gram (-) e diferencial para espécies fermentadoras da lactose. As bactérias fermentadoras de lactose formam colónias vermelhas ou rosa. As bactérias não fermentadoras de lactose formam colónias incolores.
Gelose Hektoen (HEKT)	Meio de isolamento seletivo e de diferenciação destinado à pesquisa das <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> Este meio contém 3 tipos de açúcares e os microrganismos que fermentam um dos três originam colónias amarelas ou salmão. A ausência de fermentação resulta numa coloração azul ou verde das colónias. A produção de sulfureto de hidrogénio (H ₂ S) caracteriza-se pelo aparecimento de colónias com um centro negro. As gram positivas são inibidas por sais biliares e corantes (azul de bromotimol e fucsina ácida).
Gelose Chapman 2 (MSA2)	Meio seletivo para o isolamento e a contagem de <i>Staphylococcus</i> . É também utilizado para a diferenciação entre as espécies fermentadoras de manitol e as espécies não fermentadoras de manitol. A seletividade deste meio baseia-se na presença de cloreto de sódio, o qual inibe o crescimento da maioria das bactérias e Gram (-). A diferenciação dos <i>Staphylococcus</i> baseia-se na sua capacidade de fermentação do manitol. Manitol (+): a cor do meio torna-se amarela. Manitol (-): sem coloração.
Gelose chromID® Salmonella ELITE (SALM)	Meio cromogénico para o isolamento seletivo e a identificação de <i>Salmonella</i> . A diferenciação das estirpes de <i>Salmonella</i> baseia-se no aparecimento de uma coloração malva pálida a malva das colónias. As outras estirpes bacterianas desenvolvem colónias de cores diferentes. A mistura seletiva permite inibir bactérias Gram (+), algumas bactérias Gram (-), leveduras e bolores.
Gelose chromID™ Strepto B (STRB)	Meio cromogénico seletivo para a deteção dos <i>Streptococcus</i> do grupo B. Permite detetar <i>S.agalactiae</i> que adquire uma coloração rosa-pálido ou vermelho. A maioria das outras espécies bacterianas e leveduras não se desenvolvem neste meio ou não formam colónias características.
Gelose Yersinia CIN (YER)	Meio de isolamento seletivo destinado à deteção e diferenciação das diferentes espécies de <i>Yersinia</i> . O manitol e o vermelho neutro, presentes no meio, permitem uma diferenciação das <i>Yersinia</i> pela coloração das colónias rosa-escuro a vermelhas.

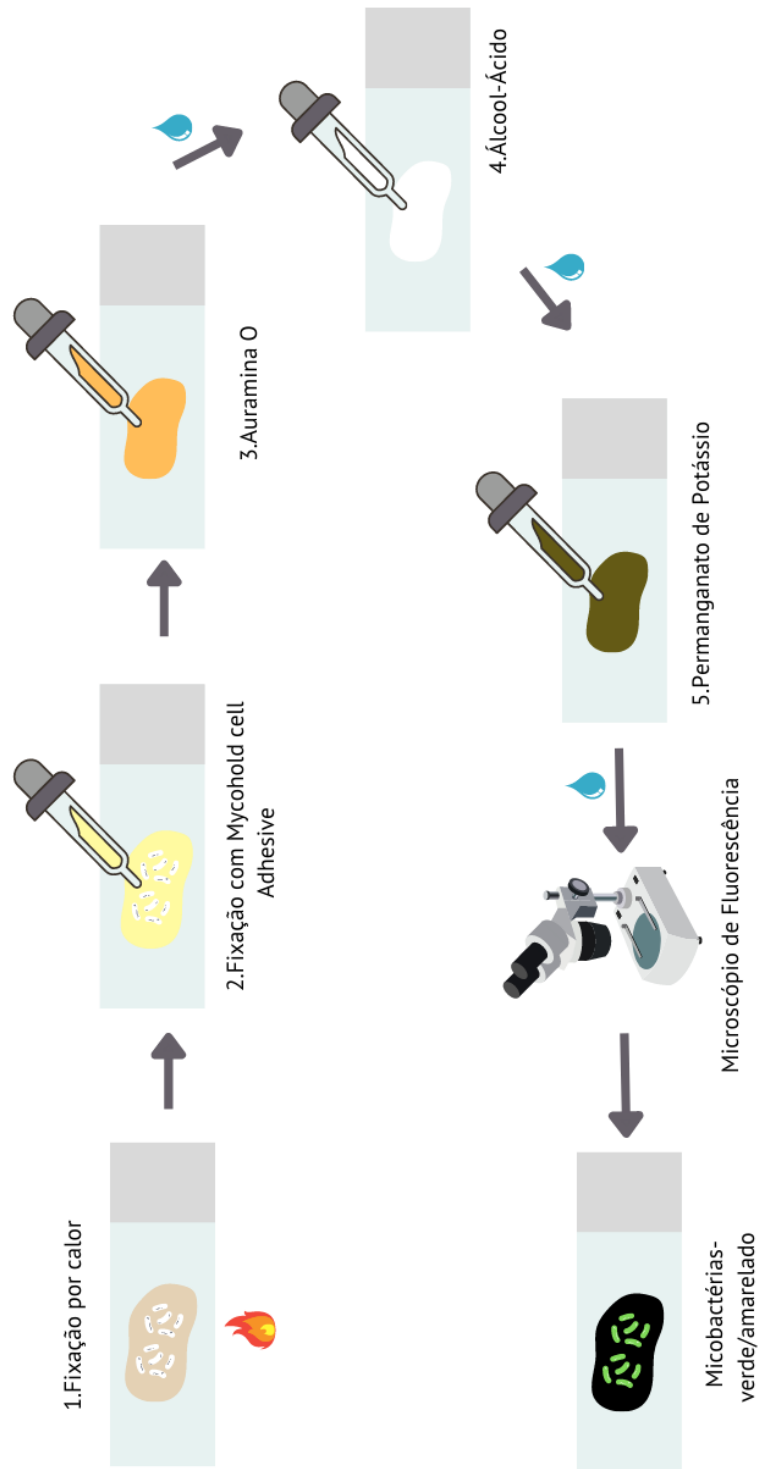
Anexo 4 (Cont.): Meios de cultura usados no CHTS (17,18,20,103–105)

Meio	Características do meio
Gelose chromID® MRSA SMART (MRSM)	Meio cromogénico destinado ao rastreio de estirpes de <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina. Contém também substratos cromogénicos e uma associação de antibióticos que permite a deteção direta das estirpes de MRSA pela revelação da atividade enzimática (formam-se colónias rosa a vermelho).
Gelose chromID® CARBA SMART (CARB/OXA)	Meio cromogénico seletivo para a deteção de todas as <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases. Permite detetar OXA-48 num lado da placa e outras <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases (KPC e NDM-1), no outro.
Gelose de Campyloset (CAM)	Meio seletivos para o isolamento de <i>Campylobacter</i> intestinais.
Gelose de Sabouraud (SGC2)	Meio seletivo para o isolamento de fungos. O crescimento dos fungos é promovido pelos nutrientes proporcionados pelas peptonas e pela glucose. A gentamicina e o cloranfenicol inibem o crescimento da maioria das bactérias, como é o caso das Enterobactérias, <i>Pseudomonas</i> e <i>Staphylococcus</i> .
Caldo Tioglicolato com resazurina (THIO-T)	Caldo de enriquecimento não seletivo de microrganismos não exigentes.
Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)	Caldo de enriquecimento seletivo para os <i>Streptococcus</i> do grupo B.
Meio Löwenstein-Jensen (LJ-T)	Meio para cultura de micobactérias. A seletividade deste meio baseia-se na presença de verde de malaquite e sais minerais, os quais inibem o crescimento da maioria dos organismos contaminantes. O crescimento das micobactérias é promovido pelos nutrientes proporcionados.
Caldo GN Broth (GN)	Caldo de enriquecimento seletivo para cultura de microrganismos entéricos Gram (-).
Mycobacteria growth indicator tube (MGIT)	Meio líquido utilizado para a cultura de micobactérias.

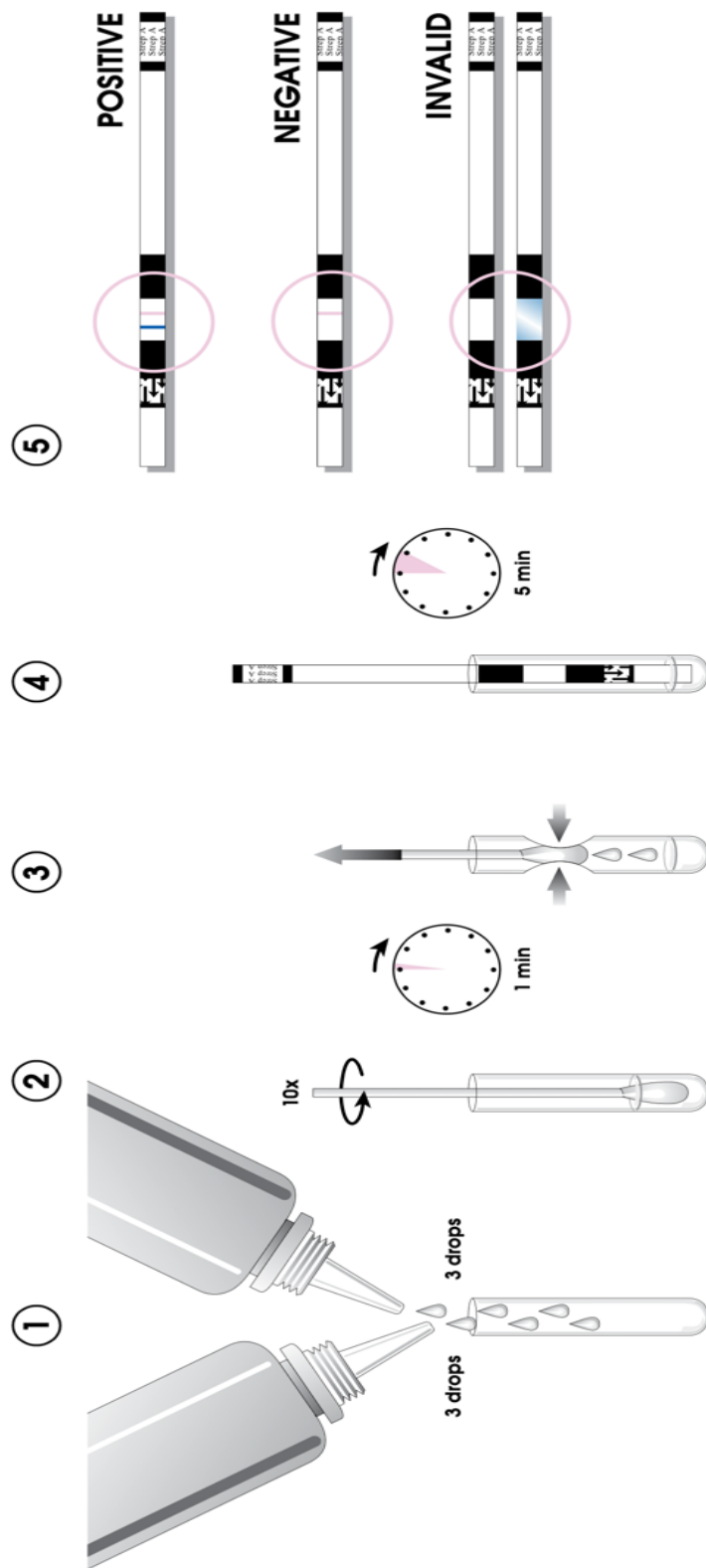
Anexo 5: Procedimento da Coloração de Gram (18)



Anexo 6: Procedimento da Coloração de Auramina (19)



Anexo 7: Procedimento e demonstração dos resultados do OSOM® Strep A Test (26)



Anexo 8: Parecer da Comissão de Ética do CHTS para a realização do estudo



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE 1979-2019



Exmo. (a) Senhor(a)

Dra Ana Rita Leite da Silva

aritas2805@icloud.com

SUA REFERÊNCIA

SUA COMUNICAÇÃO DE

NOSSA REFERÊNCIA
PROC. Nº: 05/2023

DATA
13/06/2023

ASSUNTO: ***“A relação dos valores de procalcitonina com os microorganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS no ano de 2022.”***

Exma Senhora Dra Ana Rita Leite da Silva,

Acusamos a receção do seu pedido para realização do estudo ***“A relação dos valores de procalcitonina com os microorganismos presentes em hemoculturas positivas em utentes do CHTS no ano de 2022”***.

Agradecemos a preferência pela nossa instituição.

A Comissão Ética de Saúde não tem objeção ética à realização do estudo no CHTS, nas condições referidas no mesmo.

Informamos que, em reunião de Conselho de Administração de 07/06/2023 foi autorizada a realização do estudo, podendo o mesmo dar início, nos termos do Parecer da Comissão.

No final da realização do estudo deverá entregar, no Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa, no Serviço de Ensino, Formação e Investigação (SEFI), **o relatório final, sendo este de carácter obrigatório.**

Estamos ao dispor para qualquer informação ou esclarecimento que entenda solicitar.

Com os melhores cumprimentos,

A Diretora do SEFI,



(Eliana Pereira, Dra)