

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**ANTIBIÓTICOS: POTENCIALIZADORES DA SOBREVIVÊNCIA DA  
VIDA HUMANA OU BACTERIANA?**

Rita Carolina Monteiro Luzio

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Maria Isabel Nobre Franco de Portugal Dias Jordão e coorientado pelo Doutor Carlos Rodriguez Diez Gonçalves de Oliveira.

Mestrado em Análises Clínicas

2023

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**ANTIBIÓTICOS: POTENCIALIZADORES DA SOBREVIVÊNCIA DA  
VIDA HUMANA OU BACTERIANA?**

Rita Carolina Monteiro Luzio

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Maria Isabel Nobre Franco de Portugal Dias Jordão e coorientado pelo Doutor Carlos Rodriguez Diez Gonçalves de Oliveira.

Mestrado em Análises Clínicas

2023

## Resumo

---

O presente trabalho é parte integrante do plano de estudos e elemento de avaliação do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. É composto por duas partes: uma primeira, que constitui o Relatório de Estágio e uma segunda, que constitui a monografia.

O estágio profissional realizou-se no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves no período compreendido entre 21/04/2022 a 15/09/2022 e entre 14/11/2022 a 25/11/2022.

O Relatório de Estágio faz uma apresentação do local de estágio e descreve algumas das atividades desenvolvidas nos departamentos de imunologia, core laboratorial e química analítica do laboratório. Em cada secção do relatório foi escolhida uma lista de parâmetros analíticos para os quais se proporcionou uma introdução teórica que apresenta os aspetos relevantes para a compreensão do significado clínico de cada um, informação acerca do tipo de produto biológico necessário para a sua determinação e os fundamentos dos métodos e equipamento utilizado para tal.

A segunda parte constitui a monografia, uma revisão bibliográfica que explora o tema: "Antibióticos: Potencializadores da Sobrevivência da Vida Humana ou Bacteriana?"

A resistência aos antibióticos é considerada, pela Organização Mundial de Saúde, como uma das maiores ameaças de saúde pública. É um problema global e emergente que põe em risco a capacidade de tratar as doenças infecciosas mais comuns, uma vez que diminui a efetividade dos antibióticos. Esta monografia pretende abordar este problema da atualidade, mencionando alguns dos mecanismos de resistência mais comuns, focando-se nas suas consequências bem como medidas e alternativas que podem ser implementadas e que podem ajudar a combater a resistência bacteriana aos antibióticos.

**Palavras-chave:** antibióticos, resistência aos antibióticos, mecanismos de resistência, MRSA.

## Abstract

---

The present work is an integral part of the study plan and an evaluation element of the Master's In Laboratory Medicine of the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon. It consists of two parts: the first part comprises the Internship Report and the second part comprises the monograph.

The professional internship took place at Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves from 04/21/2022 to 09/15/2022 and from 11/14/2022 to 11/25/2022.

The Internship Report presents the internship location and describes some of the activities conducted in the immunology, laboratory core and analytical chemistry departments. In each section of the report, a list of analytical parameters was chosen. For each was provided a theoretical introduction which includes relevant aspects for understanding the clinical significance of each parameter, information about the type of biological sample necessary for its determination and the fundamentals of each method and equipment used for this purpose.

The second part constitutes the monograph, a bibliographic review that explores the theme: "Antibiotics: Enhancers of the Survival of Human or Bacterial Life?"

The World Health Organization has considered antibiotic resistance as one of the greatest threats to public health. It is a global and emerging problem that threatens the ability to treat the most common infectious diseases, as it reduces the effectiveness of antibiotics. This monograph intends to address this current problem, mentioning the most common resistance mechanisms, focusing on its consequences as well as giving examples of courses of action and alternatives that can be implemented to help combat bacterial resistance to antibiotics.

**Key words:** antibiotics, antibiotic resistance, resistance mechanisms, MRSA.

# Índice

---

<b>Resumo .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>4</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>9</b>
<b>Siglas e Abreviaturas .....</b>	<b>10</b>
<b>Capítulo 1 – Relatório de Estágio .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>14</b>
1.1 Objetivo.....	14
1.2 Caracterização do Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves .....	14
1.2.1 Missão, Visão e Valores.....	15
1.3 Controlo de Qualidade .....	15
1.3.1 Controlo de Qualidade Interno.....	15
1.3.2 Avaliação Externa da Qualidade .....	16
1.4 Fluxograma Geral de Trabalho .....	16
<b>2. Imunologia.....</b>	<b>18</b>
2.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática .....	18
2.1.1 Tipos de ELISA.....	19
2.1.2 Determinação Quantitativa da Pró-insulina no Soro .....	20
2.1.3 Determinação das Imunoglobulinas IgG/IgM Parainfluenza Tipo 3.....	21
2.1.4 Determinação de Imunoglobulinas IgG Anti <i>Helicobacter pylori</i> .....	22
2.2 Imunoblot .....	23
2.2.1 Vírus da Imunodeficiência Humana.....	23
2.2.2 Vírus da Hepatite C.....	24
2.3 Testes de Aglutinação Serológicos .....	25
2.3.1 Teste não Treponémico da Sífilis.....	25
2.3.2 Teste de Widal.....	26
2.3.3 Teste Weil-Felix.....	26
2.4 Bioquímica .....	27
2.4.1 Determinação dos Oxalatos na Urina .....	27
2.4.2 Determinação da Xilose .....	27
2.4.3 Determinação da Glucose-6-fosfato Desidrogenase.....	28
2.5 Autoimunidade .....	29
2.5.1 Imunofluorescência Indireta .....	29

2.6	Calprotectina Fecal.....	31
2.7	Análise do Esperma.....	32
2.7.1	Espermograma.....	32
2.7.2	Determinação da Taxa de Fragmentação do DNA Espermático .....	33
<b>3.</b>	<b>Core Laboratorial .....</b>	<b>35</b>
3.1	Bioquímica .....	35
3.1.1	Módulo Cobas® 8000 ISE .....	36
3.1.2	Módulo Cobas® c 702.....	37
3.1.3	Módulo Cobas® e 801 .....	39
3.1.4	Módulo Cobas® c 502.....	42
3.1.5	Módulo Cobas® e 602 .....	42
3.1.6	Série de Analisadores da Urina: Cobas® 6500 .....	43
3.2	Hematologia .....	48
3.2.1	Hemograma .....	48
3.2.2	Esfregaço de Sangue .....	51
3.2.3	Velocidade de Sedimentação.....	52
3.2.4	Hemoglobina Glicada.....	52
3.2.5	Imunohematologia.....	53
<b>4.</b>	<b>Química Analítica .....</b>	<b>55</b>
4.1	Prova da Lactose – Teste Respiratório de Intolerância à Lactose .....	55
4.2	Cálculos Renais.....	56
4.3	Porfirinas no Plasma e na Urina.....	56
4.4	Cobre na Urina .....	57
<b>5.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>59</b>
	<b>Capítulo 2 - Monografia .....</b>	<b>60</b>
<b>1.</b>	<b>Antibióticos.....</b>	<b>61</b>
1.1	Perspetiva Histórica .....	61
1.1.1	Era Pré Antibióticos .....	61
1.1.2	Era dos Antibióticos.....	62
<b>2.</b>	<b>Classes de Antibióticos .....</b>	<b>64</b>
2.1	$\beta$ -Lactâmicos.....	64
2.2	Quinolonas e Fluoroquinolonas .....	64
2.3	Aminoglicosídeos.....	65

2.4	Glicopéptidos .....	66
2.5	Macrólidos.....	66
2.6	Tetraciclinas .....	66
2.7	Oxazolidinonas.....	67
2.8	Fosfomicina.....	67
<b>3.</b>	<b>Resistência Bacteriana aos Antibióticos.....</b>	<b>68</b>
3.1	Genética.....	68
3.1.1	Mutações .....	68
3.1.2	Hipermutantes.....	69
3.1.3	Mutagênese Adaptativa.....	69
3.1.4	Transferência Horizontal de Genes .....	69
3.2	Mecanismos de Resistência.....	70
3.2.1	Inativação ou Modificação do Antibiótico.....	70
3.2.2	Modificação do Alvo.....	71
3.2.3	Modificações ao Nível da Membrana .....	72
<b>4.</b>	<b>O Exemplo de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes .....</b>	<b>74</b>
4.1	Características Gerais.....	74
4.2	Patogenicidade .....	74
4.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes.....	74
4.2.2	Epidemiologia .....	75
4.3	Fatores de Virulência .....	75
4.3.1	Início da Infecção.....	75
4.3.2	Formação do Abscesso .....	76
4.3.3	Infecção Sistêmica .....	76
<b>5.</b>	<b>Impacto das Ações Humanas no Desenvolvimento e na Propagação de Resistência..</b>	<b>77</b>
5.1	Uso Inadequado de Antibióticos .....	77
5.1.1	Falta de Conhecimento por Parte da Comunidade.....	77
5.1.2	Automedicação.....	77
5.1.3	Atitude dos Prestadores de Cuidados de Saúde .....	78
5.1.4	Falta de Formação dos Prestadores de Cuidados de Saúde.....	78
5.1.5	Influência da Indústria Farmacêutica .....	79
5.1.6	Falta de Diagnóstico Rápido e Suficiente ou Dados Sobre a Suscetibilidade aos Antibióticos .....	79
5.2	Sistemas de Tratamento de Águas Residuais.....	79

5.3 Indústria de Produção de Antibióticos .....	80
5.4 Resíduos Humanos e Animais .....	80
5.5 Bactérias comensais .....	81
<b>6. Impacto da Resistência dos Antibióticos na Vida Humana .....</b>	<b>82</b>
6.1 Impacto Clínico e Económico .....	82
6.2 Estratégias para Melhorar o Problema da Resistência aos Antibióticos .....	83
<b>7. A Resistência aos Antibióticos e a Pandemia .....</b>	<b>85</b>
7.1 Impacto na Recolha de Dados Estatísticos de Resistência aos Antibióticos .....	85
7.2 Impacto na Prevenção de Infecções .....	85
7.3 Impacto no Uso de Antibióticos.....	85
7.4 Investimento na Terapia .....	86
7.5 Coinfeções e Infecções Secundárias .....	86
<b>8. O Futuro dos Antibióticos .....</b>	<b>88</b>
8.1 Bacteriófagos.....	88
8.2 Inibição da Virulência Bacteriana.....	90
8.3 Anticorpos Antibacterianos.....	91
8.4 Desafios e Perspetivas Futuras .....	91
<b>Bibliografia .....</b>	<b>93</b>

## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1. Esquema geral do fluxograma de trabalho aplicado no laboratório.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 2. Representação esquemática de exemplos dos diferentes tipos de ELISA....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3. Representação esquemática do ensaio de imunofluorescência indireta.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Representação esquemática da célula de medição de ECL.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 5. Representação esquemática da reação de ECL.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 6. Representação esquemática do princípio da impedância com foco hidrodinâmico.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 7. Mecanismo de resistência de modificação do antibiótico por hidrólise .....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 8. Mecanismo de resistência de modificação do antibiótico por adição de grupos .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 9. Mecanismo de resistência de modificação do alvo do antibiótico.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 10. Mecanismo de resistência devido à presença de bombas de efluxo.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 11. Mecanismo de resistência de alteração da permeabilidade da membrana.</b>	<b>73</b>

## Siglas e Abreviaturas

---

<b>ADP</b>	( <i>Adenosine Diphosphate</i> ) Adenosina Difosfato
<b>AEQ</b>	Avaliação Externa da Qualidade
<b>ALT</b>	( <i>Alanine Transaminase</i> ) Alanina Aminotransferase
<b>ANA</b>	( <i>Antinuclear Antibodies</i> ) Anticorpos Antinucleares
<b>AST</b>	( <i>Aspartate Transaminases</i> ) Aspartato Aminotransferase
<b>ATP</b>	( <i>Adenosine triphosphate</i> ) Adenosina Trifosfato
<b>CA-MRSA</b>	( <i>Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> ) <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes Associados à Comunidade
<b>CDC</b>	Centro para o Controlo e Prevenção de Doenças
<b>CHGM</b>	Concentração de Hemoglobina Globular Média
<b>CK</b>	( <i>Creatine kinase</i> ) Creatina Cinase
<b>CK-BB</b>	Isoforma da Creatina Cinase do Cérebro
<b>CK-MB</b>	Isoforma da Creatina Cinase do Coração
<b>CK-MM</b>	Isoforma da Creatina Cinase do Músculo Esquelético
<b>C1fA</b>	( <i>Clumping Factor A</i> ) Fator de Aglutinação A
<b>C1fB</b>	( <i>Clumping Factor B</i> ) Fator de Aglutinação B
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>Cna</b>	Adesina de Ligação ao Colagénio
<b>CQI</b>	Controlo de Qualidade Interno
<b>DMTC</b>	Doença Mista do Tecido Conjuntivo
<b>DNA</b>	( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ) Ácido Desoxirribonucleico
<b>DNA</b>	( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ) Ácido Desoxirribonucleico
<b>ECL</b>	( <i>ElectroChemiLuminescence</i> ) Eletroquimioluminescência
<b>ELISA</b>	( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ) Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>FnBPA</b>	( <i>Fibronectin-Binding Protein A</i> ) Proteína de ligação à fibronectina A
<b>FnBPB</b>	( <i>Fibronectin-Binding Protein B</i> ) Proteína de ligação à fibronectina B
<b>G6PD</b>	Glucose-6-Fosfato Desidrogenase
<b>HA-MRSA</b>	( <i>Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> ) <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes Associados aos Cuidados de Saúde
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	Hemoglobina Glicada

<b>hCG</b>	<i>(Human Chorionic Gonadotropin)</i> Gonadotrofina Coriônica Humana
<b>HCV</b>	<i>(Hepatitis C Virus)</i> Vírus da Hepatite C
<b>HGM</b>	Hemoglobina Globular Média
<b>HIV</b>	<i>(Human Immunodeficiency Virus)</i> Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HK</b>	Hexocinase
<b>HPIV</b>	<i>(Human Parainfluenza Viruses)</i> Vírus Humanos Parainfluenza
<b>HPLC</b>	<i>(High-Performance Liquid Chromatography)</i> Cromatografia Líquida de Alta-Definição
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>JCS</b>	Joaquim Chaves Saúde
<b>LA-MRSA</b>	<i>(Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus)</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes associadas à pecuária
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquidiano
<b>LDH</b>	Lactato Desidrogenase
<b>LES</b>	Lupus Eritematoso Sistémico
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MDH</b>	Malato Desidrogenase
<b>MRSA</b>	<i>(Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus)</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes
<b>Mt-CK</b>	Isoforma Mitocondrial da Creatina Cinase
<b>NAD</b>	<i>(Nicotinamide Adenine Dinucleotide)</i> Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NADP</b>	<i>(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)</i> Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
<b>OCDE</b>	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económicos
<b>PBPs</b>	<i>(Penicillin-Binding Proteins)</i> Proteínas de Ligação à Penicilina
<b>RDW</b>	<i>(Red Cell Distribution Width)</i> Coeficiente de Dispersão do Volume Eritrocitário
<b>RNA</b>	<i>(Ribonucleic Acid)</i> Ácido Ribonucleico
<b>RNA</b>	<i>(Ribonucleic Acid)</i> Ácido Ribonucleico
<b>RPR</b>	<i>(Rapid Plasma Reagin Test)</i> Teste Rápido do Reagente Plasmático
<b>rRNA</b>	<i>(Ribosomal Ribonucleic Acid)</i> Ácido Ribonucleico Ribossomal

<b>SCA</b>	<i>Sperm Class Analyzer</i>
<b>SCCmec</b>	<i>(Staphylococcal Cassette Chromosome mec)</i> Cassete Cromossomal mec
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SLS</b>	Sulfato Lauril de Sódio
<b>TPA</b>	Tripropilamina
<b>tRNA</b>	<i>(Transfer Ribonucleic Acid)</i> Ácido Ribonucleico de Transferência
<b>VGM</b>	Volume Globular Médio

# **Capítulo 1**

## **Relatório de Estágio**

# 1. Introdução

---

O Relatório de Estágio tem como finalidade a apresentação do local de estágio, sendo parte dos seus constituintes a descrição das atividades que foram desenvolvidas em cada um dos departamentos do laboratório. O laboratório encontra-se dividido em sete departamentos analíticos específicos: o serviço de genética, o core laboratorial, a imunologia, a química analítica, o radioimunoensaio, a microbiologia e a biologia molecular.

O relatório de estágio vai incidir sobre os períodos de estágio realizados nos departamentos de imunologia, do core laboratorial e da química analítica. Em cada secção do relatório foi escolhida uma lista de parâmetros analíticos para os quais se proporcionou uma pequena introdução teórica que apresenta os aspetos mais relevantes para a compreensão do significado clínico de cada um, informação acerca do tipo de produto biológico necessário para a sua determinação e os fundamentos dos métodos e equipamento utilizado para tal.

O estágio profissional realizou-se no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves no período compreendido entre 21/04/2022 a 15/09/2022 e entre 14/11/2022 a 25/11/2022.

## 1.1 Objetivo

O estágio bem como a realização do relatório de estágio têm como principais objetivos aprofundar e consolidar os conhecimentos teóricos obtidos durante o Mestrado em Análises Clínicas, proporcionar a aquisição de competências de organização e métodos de trabalho típicos da rotina de um laboratório de análises clínicas.

## 1.2 Caracterização do Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves

A Joaquim Chaves Saúde (JCS) é um grupo português fundado em 1959 e com atividade exclusiva no sector da saúde que participa com competência e qualidade no progresso da medicina, apresentando um percurso de rigor e de qualidade na prestação de cuidados de saúde.

O Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves foi a primeira empresa a ser constituída, e foi após a sua constituição que o grupo JCS cresceu de forma sustentada no sector da saúde com a sucessiva abertura de unidades em Portugal Continental, Madeira e Açores, com particular destaque para as áreas de Laboratório como as Análises Clínicas, Clínicas Médicas e o Tratamento Oncológico.

O Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves é considerado uma referência de qualidade e rigor baseada na excelência dos seus profissionais e da tecnologia de que dispõe. O laboratório disponibiliza um painel de mais de 4200 parâmetros analíticos, de rotina e de urgência, e apresenta uma resposta rápida e eficaz no apoio à clínica.

### 1.2.1 Missão, Visão e Valores

O grupo JCS tem como motivação e compromisso proporcionar aos utentes o acesso às melhores soluções atualmente existentes no setor da saúde, aliando uma elevada competência e especialização humana à disponibilização das tecnologias mais avançadas.

A visão do grupo JCS é estar presente para os utentes, existindo um acompanhamento e uma proximidade permanentes entre as duas partes, tanto ao nível das análises clínicas como das clínicas médicas e do tratamento oncológico.

O grupo JCS garante uma intervenção diferenciada e de qualidade, cada vez mais próxima e humanizada, nas mais diversas áreas da medicina moderna. Na Joaquim Chaves Saúde, os utentes são a principal preocupação, sendo que servi-los, estar atento e satisfazer as suas necessidades é o objetivo prioritário. O grupo JCS estimula um clima familiar, onde se respira saúde e, por isso, é também transversal a toda a atividade do grupo, o respeito pelo meio ambiente.

## 1.3 Controlo de Qualidade

A qualidade dos serviços do laboratório é assegurada por um sistema interno de controlo de qualidade e pela participação periódica em programas internacionais de avaliação externa da qualidade.

Todos os laboratórios que executam exames laboratoriais devem ter em funcionamento um sistema de garantia e gestão da qualidade, dinâmico e contínuo. Este traduz-se na existência de procedimentos escritos que abrangem todas as áreas do laboratório e onde estão descritas as diferentes etapas de realização dos parâmetros analíticos e como estes são executados. Para além disso, abrange a descrição da formação e qualificação do pessoal técnico e administrativo do laboratório. No âmbito dos laboratórios de análises clínicas, a garantia da qualidade permite ter o domínio da organização de todas as tarefas que levam à qualidade, pelo que abrange as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica e inclui procedimentos de controlo como o controlo de qualidade interno (CQI) e a avaliação externa da qualidade (AEQ) [1].

A norma ISO 9001 está consolidada na maior parte das unidades da Joaquim Chaves Saúde, realizando-se auditorias externas anuais a todas as unidades certificadas, incluindo o Laboratório de Análises Clínicas.

### 1.3.1 Controlo de Qualidade Interno

O CQI é, por definição, o conjunto de procedimentos adotados pelo laboratório que têm como finalidade permitir o controlo da qualidade dos resultados das análises ao longo de todo o processo analítico [1]. O controlo da qualidade interno é organizado pelo responsável da garantia da qualidade e é indispensável para a deteção de anomalias, avaliação de erros e sua imediata correção [1].

No Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves o controlo de qualidade interno é realizado diariamente e transversalmente a todas as áreas do laboratório. Normalmente, os

controles são realizados antes ou durante a técnica de maneira a garantir que os resultados das amostras dos utentes estão válidos. Para além da rotina diária normal, existem outras situações em que é necessário processar os controles, como por exemplo, após calibração, após mudança de reagente, após manutenção do equipamento ou sempre que se achar ser necessário.

### 1.3.2 Avaliação Externa da Qualidade

A avaliação externa da qualidade corresponde à avaliação da qualidade dos resultados do laboratório por uma organização exterior [1]. O laboratório deve participar em programas de avaliação externa da qualidade tanto nacionais como internacionais de modo a poder ser avaliado no que diz respeito à exatidão dos seus resultados.

No Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves as amostras de conteúdo desconhecido do programa de avaliação externa da qualidade são processadas da mesma maneira que as amostras dos utentes e de acordo com um calendário previamente enviado. A avaliação externa da qualidade permite a comparação objetiva do desempenho laboratorial com as especificações de desempenho analítico e a comparação do laboratório com outros laboratórios.

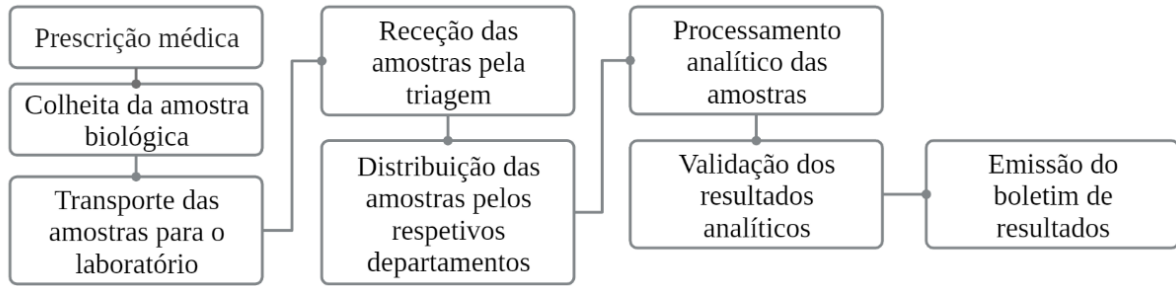
## 1.4 Fluxograma Geral de Trabalho

O fluxograma de trabalho tem início no consultório médico com a prescrição das análises clínicas. Seguida a prescrição médica, realizada com base na sintomatologia do utente, este dirige-se para um dos postos de colheita do laboratório onde efetua a respetiva colheita das amostras biológicas necessárias à determinação dos parâmetros prescritos pelo médico. É no momento da colheita que é atribuído um número de processo a cada utente e um número de tubo que identifica todos os tubos daquele utente recolhidos naquela colheita específica. Para além disso, também se obtém informações como o nome, idade, morada, e outras consideradas pertinentes para a interpretação das análises prescritas.

Após colheita, as amostras são recolhidas pela rede de transportes do laboratório, para onde são enviadas. Na chegada das amostras ao laboratório, estas são rececionadas pela triagem onde é verificada a sua conformidade e se faz o registo de falhas de colheita, com conseqüente comunicação ao posto de colheita, laboratório ou hospital. É também na triagem que se procede à separação das amostras de acordo com o seu departamento de destino e onde se efetua a centrifugação de alguns tubos.

Os técnicos de triagem procedem depois à distribuição das amostras pelos respetivos departamentos do laboratório. A maioria das amostras fica na secção pré-analítica do core laboratorial onde são efetuadas as alíquotas das amostras, que depois são distribuídas para o departamento respetivo. No departamento, as amostras são processadas de acordo com os protocolos técnicos e de qualidade estipulados para cada parâmetro analítico pelo laboratório.

Após a determinação dos resultados dos parâmetros analíticos, estes são validados pelos especialistas do departamento, com a conseqüente emissão do boletim de resultados que é depois enviado para o utente ou recolhido por este no posto de colheita.



**Figura 1. Esquema geral do fluxograma de trabalho aplicado no laboratório.**

## 2. Imunologia

---

No departamento de Imunologia realizam-se análises que permitem o estudo qualitativo ou quantitativo ou a caracterização de anticorpos e antígenos. É também neste departamento que se deteta a presença de marcadores séricos característicos de doença infecciosa resultantes da resposta do hospedeiro a diversos agentes agressores, permitindo assim o seu diagnóstico. Por exemplo, faz-se a pesquisa direta de vírus, bactérias, fungos e parasitas. Para além disso, efetuam-se análises de determinação de citocinas, moléculas de adesão, péptidos e antioxidantes, realizam-se estudos da auto reatividade através da pesquisa e doseamento dos autoanticorpos ou da identificação das suas especificidades antigénicas.

O departamento de Imunologia está organizado em diversas secções. A cada uma está atribuído um determinado número de técnicas que são realizadas pelos técnicos responsáveis por essa secção. Assim, existe uma secção dedicada maioritariamente à realização de métodos serológicos, outra dedicada à realização de técnicas de autoimunidade, outra dedicada às doenças infecciosas, uma dedicada a técnicas bioquímicas, uma dedicada maioritariamente a técnicas de imunoabsorção enzimática, entre outras.

**Período de estágio:** 30/05/2022 – 01/07/2022

**Atividades realizadas/acompanhadas:** Processamento de amostras de utentes bem como amostras da AEQ, manutenção de equipamentos, execução e avaliação do CQI, validação técnica de resultados, gestão de *stocks*.

### 2.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um método analítico baseado no conceito da reação antígeno-anticorpo que acontece entre os anticorpos produzidos pelos linfócitos e os seus respetivos antígenos [2].

É um método analítico quantitativo que permite identificar a presença e concentração de diversos tipos de moléculas através da deteção da formação de ligações antígeno-anticorpo por meio de um conjugado enzimático e do seu respetivo substrato [3].

Por meio desta reação antígeno-anticorpo é possível detetar analitos com concentrações muito baixas como péptidos/proteínas, hormonas, vitaminas, ácido nucleicos, entre outras, com baixo risco de interferência devido à alta especificidade desta ligação [2,3].

De uma forma geral, neste método existe primeiramente a ligação do antígeno ou anticorpo à fase sólida (normalmente microplacas de poliestireno, polivinil ou polipropileno). Após adição do analito existe a formação de uma ligação com o antígeno/anticorpo presente na fase sólida. De seguida existe um passo de lavagem que tem como objetivo remover os constituintes que não se ligaram aos componentes da fase sólida. A ligação antígeno-anticorpo formada é depois medida pela mudança de cor que se observa ao se adicionar um conjugado enzimático e o seu substrato correspondente. O produto final pode ser detetado após paragem da reação enzimática por leitura espectral da microplaca no leitor de microplacas. Por fim, a absorbância lida é convertida em concentração com recurso a calibradores [4].

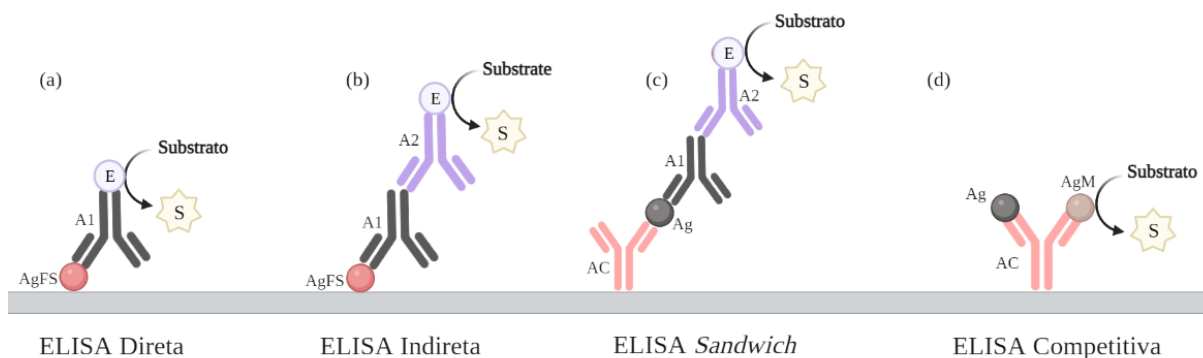
As enzimas mais comumente utilizadas na marcação de anticorpos nos *kits* de ELISA são: a  $\beta$ -galactosidase, glucose oxidase, peroxidase e a fosfatase alcalina [5]. A reação enzimática é parada por adição de hidróxido de sódio, ácido clorídrico ou ácido sulfúrico. Depois de parada a reação, os resultados são lidos no espectrofotómetro entre 400 e 600 nm [3].

Este é um método que apresenta inúmeras vantagens, entre as quais podemos destacar: a simplicidade de execução do método, a alta especificidade e sensibilidade devidas à reação antígeno-anticorpo, a alta eficiência, a segurança do ensaio livre dos riscos de radiação e o facto de serem utilizados reagentes com relativamente baixo custo e em baixo volume [2,6].

### 2.1.1 Tipos de ELISA

Os ensaios imunoenzimáticos podem ser classificados em heterogéneos e homogéneos. Os ensaios heterogéneos caracterizam-se por apresentarem os complexos antígeno-anticorpo fisicamente separados do antígeno/anticorpo livres por via da utilização de um sistema de fase sólida. Por outro lado, nos ensaios homogéneos não existe essa separação, sendo que neste caso a ligação do antígeno ao anticorpo modifica a atividade da enzima sendo esta modificação proporcional à concentração do analítico de interesse [7].

O método de ELISA é um ensaio imunoenzimático heterogéneo utilizado para a deteção de uma enorme variedade de analitos solúveis específicos, pelo que existiu a necessidade de desenvolver diferentes tipos de ELISA adaptados às diferenças entre analitos, e assim melhorar a especificidade do ensaio [3].



**Figura 2. Representação esquemática de exemplos dos diferentes tipos de ELISA.**

A1: Anticorpo primário; A2: Anticorpo secundário; AC: Anticorpo de captura; Ag: Antígeno da amostra; AgFS: Antígeno mobilizado na fase sólida; AgM: Antígeno marcado; E: Enzima; S: Sinal colorimétrico.

Imagem criada em biorender.com.

#### 2.1.1.1 ELISA Direta

Na ELISA direta (Figura 2a) a fase sólida contém o anticorpo/antígeno específico para o analito que se pretende determinar, ocorrendo a sua mobilização na fase sólida. A medição da concentração do analito é possível pela adição de um antígeno/anticorpo marcado por uma enzima. Depois de incubação e lavagem dos antígenos/anticorpos que não se ligaram, é adicionado o substrato enzimático que permite a produção de um sinal, através da alteração de cor, que é medido para determinar a quantidade do analito de interesse [3,8].

### 2.1.1.2 ELISA Indireta

A ELISA indireta (Figura 2b) difere da anterior, uma vez que, a concentração do analito de interesse é medida por um anticorpo secundário em vez do primário. Este passo adicional permite a amplificação do sinal [6] e tem como objetivo obter uma maior sensibilidade [9].

Na fase sólida estão imobilizados antígenos específicos que, após incubação, formam complexos antígeno-anticorpo com o anticorpo primário. Para que se consiga medir a produção deste complexo há depois a adição de um anticorpo secundário marcado com uma enzima que produz sinal após adição do seu substrato [3,6,9].

### 2.1.1.3 ELISA Sandwich

No ensaio do tipo *sandwich* (Figura 2c) existe a imobilização de anticorpos de captura na fase sólida, que se ligam ao analito de interesse e formam complexos antígeno-anticorpo. Após incubação e lavagem, estes complexos são detetados por anticorpos marcados enzimaticamente. A adição de substrato enzimático permite a medição da intensidade da coloração da reação enzimática, sendo a presença de coloração indicativa de um resultado positivo [2].

O ensaio em *sandwich* é altamente específico uma vez que requer a ligação simultânea de dois anticorpos ao analito de interesse [6].

### 2.1.1.4 ELISA Competitivo

No tipo de ensaio competitivo (Figura 2d) o analito que se pretende medir e o antígeno/anticorpo marcados são adicionados ao poço simultaneamente. Assim, o analito a ser medido e o antígeno/anticorpo marcados competem para a ligação com o anticorpo/antígeno imobilizado na fase móvel. Depois da lavagem, é adicionado o substrato enzimático o que resulta em coloração dos poços e possibilita a determinação da concentração de analito. Neste caso, existe uma relação inversa entre a concentração de analito a determinar e a intensidade da coloração no poço [6,8].

## 2.1.2 Determinação Quantitativa da Pró-insulina no Soro

A pró-insulina é um polipéptido sintetizado pelas células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans presentes no pâncreas [10], sendo posteriormente convertida em péptido C e insulina via formas intermediárias [11]. A insulina e o péptido C existem ambos em quantidades equimolares no sangue. No que diz respeito à pró-insulina, esta está presente em baixas concentrações no sangue de indivíduos saudáveis [12].

Os níveis de pró-insulina podem refletir o estado das células  $\beta$  ou uma disfunção no processo de conversão ou secreção da pró-insulina [12]. Níveis elevados de pró-insulina estão presentes em várias condições clínicas como: insulinoma e Diabetes Mellitus tipo 2 [13].

**Amostra:** Soro.

**Método:** Ensaio Imunoenzimático tipo *sandwich*.

**Equipamento:** Manual.

O *kit* utilizado é um ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich*. Neste ensaio requer-se a utilização de uma microplaca de 96 poços, onde cada poço está revestido com um anticorpo monoclonal capaz de se ligar à pró-insulina e às formas intermediárias des (31, 32)-pró-insulina e split (32, 33)-pró-insulina mas não à insulina nem ao péptido C ou outras formas “des” e “split” da pró-insulina.

Previamente ao início do ensaio existe a adição de um tampão de bloqueio que previne a ligação não específica dos componentes. De seguida, procede-se à adição de uma alíquota da amostra e incubação. Depois de lavagem para remoção dos componentes que não se ligaram, segue-se a incubação de um anticorpo anti-pró-insulina marcado enzimaticamente nos poços.

Este anticorpo possui a capacidade de se ligar apenas à pró-insulina e às formas intermediárias des (64, 65)-pró-insulina e split (65, 66)-pró-insulina mas não se liga à insulina nem ao péptido C ou outras formas “des” e “split” da pró-insulina. Assim, a combinação destes dois anticorpos num ensaio imunoenzimático do tipo *sandwich* permite a deteção de apenas a forma intacta da pró-insulina.

Após lavagem dos anticorpos marcados não ligados, procede-se à adição do substrato cromogénico da enzima. A intensidade da cor obtida é proporcional à concentração de pró-insulina presente na amostra [14].

### 2.1.3 Determinação das Imunoglobulinas IgG/IgM Parainfluenza Tipo 3

O vírus parainfluenza tipo 3 faz parte de um grupo de vírus comuns aos quais se dá o nome de vírus humanos parainfluenza (HPIV) [15]. Os HPIV são vírus que apresentam um invólucro, uma cadeia simples de RNA e pertencem à família Paramyxoviridae. De acordo com a sua variação genética e antigenética, estes podem ser divididos em quatro tipos [16].

Os vírus deste grupo ligam-se e replicam-se nas células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior e inferior, local onde causam infeção tanto em adultos como em crianças. Os HPIV estão associados a uma variedade de doenças respiratórias, como por exemplo: otite média, faringite, conjuntivite, bronquite laringo-traqueal e pneumonia [15].

As infeções devidas a HPIV-3 estão mais associadas a infeções do trato respiratório inferior, causando especialmente bronquiolites e pneumonia em recém-nascidos e bebés e apresentam uma clínica que normalmente é indistinguível daquela que é devida a infeção pelo vírus respiratório sincicial [15].

As metodologias mais comumente utilizadas para diagnóstico de infeção por vírus HPIV-3 são a neutralização do vírus, inibição da hemaglutinação, imunofluorescência indireta, fixação do complemento e ELISA.

A ELISA é um método sensível, especialmente indicado para deteção de IgM em crianças menores de 6 meses uma vez que, permite evitar a deteção de anticorpos IgG procedentes da mãe e que possam ter influência no resultado. Para além disso, a deteção da presença de IgM numa amostra de soro ajuda no diagnóstico rápido numa fase inicial da doença.

**Amostra:** Soro.

**Método:** Ensaio Imunoenzimático indireto.

**Equipamento:** Manual.

Para a realização deste ensaio utiliza-se uma microplaca de 96 poços onde se encontram fixos antigénios do vírus parainfluenza 3 na superfície de poliestireno da microplaca. O método é baseado na reação dos anticorpos presentes na amostra com o antigénio fixo. Após lavagem dos anticorpos que não se ligaram, adiciona-se um anticorpo anti-imunoglobulina (IgG ou IgM) humana marcada enzimaticamente. Após eliminação do que não se ligou, adiciona-se o substrato enzimático. Este provoca uma reação de cor azul que, após paragem da reação, se altera para amarelo. Cada poço é de seguida avaliado espectralmente num comprimento de onda de 450/620 nm.

#### 2.1.4 Determinação de Imunoglobulinas IgG Anti *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram-negativa que tem como principal reservatório o estômago humano. Esta bactéria apresenta características que permitem a sua sobrevivência em condições adversas como o ambiente ácido gástrico. A transmissão acontece normalmente via oral-fecal, principalmente através de água e comida contaminadas, no entanto a transmissão via oral-oral também é possível [17].

A infeção por *H. pylori* é uma das infeções mais comuns na população global, com uma prevalência aproximada de 50% [18]. A infeção por esta bactéria é a principal causa de gastrite crónica e úlcera péptica, no entanto *H. pylori* tem também um papel determinante no desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico e linfoma do tecido linfoide associado à mucosa [17].

**Amostra:** Soro.

**Método:** Ensaio Imunoenzimático indireto.

**Equipamento:** EUROIMMUN Analyzer I, da EUROIMMUN.

O ensaio inicia-se pela incubação das amostras nos poços de uma microplaca de 96 poços que estão revestidos com antigénios de *H. pylori*. Se for caso, durante a incubação, os anticorpos IgG presentes nas amostras ligam-se aos respetivos antigénios. Após lavagem, para eliminação do que não se ligou, existe uma nova incubação, mas agora de uma imunoglobulina do tipo IgG anti-humana marcada enzimaticamente. Após adição de substrato enzimático, esta catalisa uma reação colorida que permite quantificar anticorpos do tipo IgG anti *H. pylori* após leitura espectral da intensidade da cor num comprimento de onda de 450 nm.

Esta técnica, à semelhança de outras que não foram mencionadas, é realizada utilizando um equipamento totalmente automático, desde a diluição das amostras à leitura espectral.

## 2.2 Imunoblot

A técnica de *imunoblot* permite a deteção de anticorpos específicos na amostra do utente através do contacto desta com uma fase sólida onde estão imobilizados antigénios específicos. Assim, se na amostra estiverem presentes anticorpos específicos para os antigénios da fase sólida, estes vão ligar-se a esses antigénios [19].

Esta ligação pode posteriormente ser detetada por adição de um anticorpo marcado com fosfatase alcalina que se liga ao anticorpo da amostra. Esta enzima catalisa a reação de mudança de cor do seu substrato, pelo que se o anticorpo de interesse estiver presente então vai verificar-se o aparecimento de uma linha escura na posição do respetivo antigénio e a intensidade dessa linha é diretamente proporcional à concentração de anticorpo na amostra [19].

Os antigénios utilizados são muito puros o que permite evitar resultados falsos positivos. Para além disso, são testes relativamente rápidos e de fácil interpretação.

### 2.2.1 Vírus da Imunodeficiência Humana

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente causal da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) [20], pensando-se que tenha infetado mais de 75 milhões de pessoas em todo o mundo. A infeção pelo HIV é uma das principais causas de mortalidade e morbilidade em todo o mundo, mas em especial na África subsariana [20].

Após a transmissão do vírus, este aloja-se nos tecidos mucosos passando de seguida para os órgãos linfoides. O primeiro alvo do HIV são os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Dez dias após a transmissão, o vírus torna-se detetável no sangue e continua a sua replicação exponencial nas semanas que se seguem, atingindo um pico aos trinta dias após a transmissão, altura em que os níveis de anticorpos contra o vírus se tornam detetáveis [20].

Após este período, o sistema imunitário estabelece um controlo e a replicação viral mantém-se estável por alguns anos. Para além de causar a perda progressiva dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o HIV também é responsável por outras anomalias do sistema imunitário que causam o desenvolvimento de imunodeficiência [20].

O HIV é um vírus com invólucro que possui um genoma RNA de cadeia simples. Os genes virais codificam para uma variedade de proteínas, o gene *env* codifica as glicoproteínas gp160, gp120 e gp41; o gene *gag* codifica as proteínas p24, p17, p7 e p9; o gene *pol* codifica para as proteínas p32, p66, p51, p11 [21].

Os métodos de deteção do HIV podem ser diferenciados em métodos indiretos e diretos. Os primeiros baseiam-se na deteção serológica de anticorpos contra o HIV, enquanto os segundos se baseiam na deteção de RNA e DNA viral, deteção do antigénio p24 e cultura viral [21].

**Amostra:** Soro.

**Método:** *Imunoblot*.

**Equipamento:** Manual.

Neste ensaio, utilizam-se tiras de nitrocelulose onde se encontram proteínas características do HIV fracionadas por peso molecular. Se na amostra de soro estiverem presentes anticorpos

específicos contra o vírus então estes vão ligar-se às proteínas virais correspondentes. Posteriormente removido o que não se ligou, adiciona-se um conjugado de imunoglobulina marcada enzimaticamente que se liga aos anticorpos ligados às proteínas virais da tira, seguido de um substrato para a enzima. O excesso de conjugado é removido e adiciona-se um reagente revelador de cor que permite que os locais onde o anticorpo se ligou sejam identificados através da visualização de bandas de cor roxa. A posição e a intensidade das bandas é comparada aquela visualizada nas tiras de controlo positivo.

Um resultado positivo apresenta, pelo menos, duas das bandas das glicoproteínas gp160 e/ou gp120, gp41 ou gp24. Por outro lado, numa amostra negativa não devem estar presentes bandas.

### 2.2.2 Vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é o agente infeccioso responsável pela doença que lhe dá nome, acreditando-se que a prevalência de virémia global, ou seja, a prevalência de casos positivos para o RNA viral, é de aproximadamente 71 milhões de infetados. No entanto, a prevalência global baseada na positividade para anticorpos anti-HCV corresponde a 115 milhões de indivíduos, dos quais alguns estão livres do vírus quer espontaneamente quer como resultado do tratamento [22].

Como dito anteriormente, a infeção por HCV pode ser responsável pelo desenvolvimento de hepatite C aguda que, em 50 a 80% dos doentes, pode desenvolver para crónica. A infeção crónica despoleta um processo inflamatório crónico que pode causar problemas como fibrose do fígado, cirrose, carcinoma hepatocelular e até morte. A cura da infeção pelo HCV é dada quando não se deteta RNA viral no soro após 24 semanas ou 12 semanas após o fim da terapia [22].

O HCV é um vírus RNA da família Flaviviridae composto por um invólucro de bicamada lipídica, o qual envolve a nucleocápside viral. O vírus apresenta proteínas estruturais (core, E1 e E2) e não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) [22]. Após a transmissão e de maneira a assegurar a sua replicação, o vírus liga-se aos recetores do hepatócito e sofre endocitose entrando na célula [23].

**Amostra:** Soro.

**Método:** *Imunoblot*.

**Equipamento:** Manual.

Neste ensaio, uma tira de nitrocelulose onde se encontram antigénios do HCV é incubada com uma amostra de soro. Se na amostra de soro existirem anticorpos contra os antigénios presentes na tira, estes vão ligar-se. Depois da remoção daquilo que não se ligou, adiciona-se um conjugado anticorpo anti-humano marcado enzimaticamente. Depois da remoção do conteúdo não ligado, adiciona-se o substrato enzimático e depois uma solução que revela as bandas da tira em que houve ligação dos anticorpos da amostra.

Um resultado positivo apresenta bandas das proteínas core 1 e core 2 ou da proteína core 1 e outro antigénio ou da proteína core 2 e outro antigénio ou então apresenta banda em 3 antigénios diferentes. Por outro lado, uma amostra negativa não apresenta bandas ou então apresenta uma banda isolada na proteína NS3, NS4 ou na NS5.

## 2.3 Testes de Aglutinação Serológicos

A aglutinação caracteriza-se por ser a revelação de complexos antigénio-anticorpo sob a forma de aglomerados de partículas. Estes aglomerados formam-se, normalmente, devido à interação de antigénios insolúveis (normalmente associados a partículas de látex) com anticorpos específicos presentes no soro do utente [24]. Por exemplo, os anticorpos do soro podem ligar-se diretamente a antígenos da superfície de bactérias ou fungos causando a formação de ligações cruzadas e, consequentemente, a sua aglutinação [25].

A aglutinação é um método semi-quantitativo considerado como sensível, fácil e rápido. No entanto, depende da concentração e avidéz do antigénio, do anticorpo e do ambiente da reação [24].

Para além disso, a aglutinação sofre um fenómeno ao qual se dá o nome de prozona. Este fenómeno ocorre quando não existe aglutinação devido a um rácio elevado de anticorpo:antigénio. Este rácio faz com que todos os epítomos de uma partícula se liguem a um único anticorpo, prevenindo assim as ligações cruzadas entre partículas e a sua consequente aglutinação. Assim, de modo a evitar este fenómeno, é usual realizar diluições seriadas do soro, uma vez que utilizar apenas uma concentração da amostra pode levar a conclusões erradas [26].

Deste modo, a presença de anticorpos é testada por pesquisa de aglutinação para diluições seriadas do soro. Desta testagem obtém-se o valor da titulação do anticorpo, que corresponde à maior diluição onde ainda se verifica aglutinação [25].

Os ensaios de aglutinação podem ser classificados em diretos ou indiretos e passivos ou ativos. A aglutinação direta ocorre quando o antigénio é um constituinte natural do patógeno de interesse para detetar anticorpos específicos contra este. Neste caso é visível a formação de aglomerados que são prova da reação entre os antigénios presentes na superfície do patógeno e os anticorpos específicos do soro [24,26]. Na reação indireta, os antigénios ou anticorpos revestem a superfície de partículas, normalmente de látex [24].

Nos ensaios ativos, o epítomo de interesse está naturalmente presente nos antigénios a ser aglutinados, algo que não se verifica no ensaio passivo pelo que neste o epítomo deve ser quimicamente fixado [25].

### 2.3.1 Teste não Treponémico da Sífilis

A sífilis é uma infeção multisistémica causada pelo *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* e que é comumente transmitida via sexual, mas que pode também ser transmitida verticalmente durante a gravidez. Atualmente ainda são encontrados alguns desafios no que diz respeito ao diagnóstico desta infeção, diretamente relacionados com a interpretação dos diferentes testes e com a fase em que se encontra a doença [27].

O diagnóstico da sífilis é realizado através de métodos serológicos que detetam anticorpos treponémicos e não treponémicos. Os testes serológicos são o único meio de rastreio de indivíduos assintomáticos e o método mais utilizado no diagnóstico daqueles que apresentam sinais e sintomas sugestivos da infeção [28]. No algoritmo tradicional, utiliza-se o teste não treponémico para um rastreio inicial da doença, sendo as amostras positivas posteriormente confirmadas por um teste treponémico [29].

**Amostra:** Soro.

**Método:** Aglutinação.

**Equipamento:** Manual.

Os testes não treponémicos são testes semi-quantitativos realizados em diluições seriadas do soro do utente de maneira a detetar os anticorpos totais (IgG e IgM) que são produzidos contra antigénios lipídicos (como a cardiolipina e a lecitina) libertados de células lesadas do hospedeiro ou das bactérias [27]. Os testes não treponémicos são úteis na deteção da sífilis ativa, no entanto, alguns dos casos podem não ser detetados uma vez que a presença destes anticorpos só é identificada entre 10-15 dias após a lesão primária [28].

Para além disso, estes anticorpos não são específicos para o patógeno, sendo que a sua especificidade pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo, outras doenças que levam à produção de anticorpos contra antigénios lipídicos, levando esta situação à produção de um resultado falso-positivo [30].

O RPR é o teste não treponémico mais utilizado e caracteriza-se pela combinação dos anticorpos presentes no soro do utente com partículas de carbono revestidas com antigénios lipídicos. Esta reação é realizada em cartões de fundo branco que, juntamente com as partículas negras de carvão, permitem a visualização macroscópica da reação de aglutinação que confere a positividade do teste [27].

### 2.3.2 Teste de Widal

O teste de Widal é uma técnica serológica que tem como objetivo o diagnóstico da febre tifoide, patologia com etiologia na infeção por *Salmonella typhi* [31].

Apesar do diagnóstico definitivo da febre tifoide apenas ser possível após cultura positiva de *S. typhi* a partir de amostras de sangue, fezes, urina ou outros fluidos corporais [31,32], o teste de Widal funciona como um rastreio permitindo detetar a presença de anticorpos contra antigénios da bactéria, como é o caso do antigénio H (flagelar) e O (somático).

**Amostra:** Soro.

**Método:** Aglutinação.

**Equipamento:** Manual.

O teste é realizado em lâmina de vidro, onde se adiciona uma quantidade igual de soro e de antigénio em suspensão. A visualização de aglutinação na mistura permite confirmar a reação antigénio-anticorpo e determinar assim um resultado positivo.

### 2.3.3 Teste Weil-Felix

O teste Weil-Felix é usado no diagnóstico de riquetsioses, um conjunto de doenças infecciosas causada por bactérias gram-negativas intracelulares da família Rickettsiaceae. Os sete géneros patógenos mais conhecidos podem ser divididos em três grupos: grupo do tifo endémico e epidémico, grupo do tifo esfoliante e o grupo da febre maculosa [33].

Este teste foi desenvolvido com base no facto de alguns serotipos de bactérias do género *Proteus* apresentarem reações cruzadas antigénicas com espécies de bactérias do género *Rickettsia* [34].

Assim, através do isolamento de antigénios de *Proteus*, foi possível desenvolver uma reacção de aglutinação que identificasse anticorpos contra os diversos grupos de riquetsioses. O antigénio OX19 de *Proteus vulgaris* reage com anticorpos anti grupo tifo, o antigénio OXK de *Proteus mirabilis* reage com anticorpos anti grupo esfoliante e os antigénios OX2 e OX19 de *Proteus vulgaris* reagem com anticorpos anti grupo da febre maculosa [34].

**Amostra:** Soro.

**Método:** Aglutinação.

**Equipamento:** Manual.

O ensaio é realizado em lâminas de vidro, onde se adiciona uma quantidade igual de soro e de antigénio em suspensão. Depois de misturar é possível visualizar macroscopicamente a presença ou ausência de aglutinação na mistura por comparação com os soros controlo.

## 2.4 Bioquímica

### 2.4.1 Determinação dos Oxalatos na Urina

A urolitíase por acumulação de oxalatos é a causa mais frequente de nefrolitíase. Os oxalatos podem ter origem exógena, a partir da comida ingerida, ou endógena, sendo neste caso derivados metabólicos de precursores gerados principalmente no fígado. Para além de poderem ser parcialmente excretados via intestinal, a maioria é removido do sangue através dos rins. Os oxalatos podem precipitar e formar pedras nos rins, principalmente se se verificarem certas condições como uma concentração tubular elevada e danos ao nível do epitélio tubular [35].

**Amostra:** Urina de 24 horas ácida.

**Método:** Espectrofotometria.

**Equipamento:** Espectrofotómetro LAMBDA™ 365 UV-Vis, da PerkinElmer.

Neste método os oxalatos presentes na urina são convertidos em dióxido de carbono e peróxido de hidrogénio pela oxalato oxidase. Recorrendo à reacção de Trinder, a peroxidase reage com o peróxido de hidrogénio para formar um composto com coloração azul/violeta. A intensidade da cor produzida pela reacção é directamente proporcional à concentração de oxalatos na amostra de urina.

### 2.4.2 Determinação da Xilose

O teste da absorção da xilose é utilizado como medida da função do intestino delgado, funcionando como rastreio de utentes com suspeita de doença celíaca e outras doenças devidas

à má absorção [36]. A xilose não sofre nenhuma alteração quando é absorvida e o facto de não ser absorvida completamente permite que seja utilizada neste teste, ao contrário de outros monossacáridos, como a glucose, para os quais o intestino delgado tem uma maior capacidade de absorção [37].

**Amostra:** Soro e urina – toma previa de uma solução de 25g de xilose diluída em 200mL de água.

**Método:** Espectrofotometria.

**Equipamento:** Espectrofotómetro LAMBDA™ 365 UV-Vis, da PerkinElmer.

Neste método, a adição de uma solução ácida à amostra permite que ocorra a desidratação da xilose e, conseqüentemente a produção de furfural. Este vai reagir com o floroglucinol e formar compostos cor-de-rosa, os quais a quantidade pode ser calculada por leitura no espectrofotómetro a 554 nm [38].

### 2.4.3 Determinação da Glucose-6-fosfato Desidrogenase

A deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi a primeira enzimopatia a ser identificada e é causada por mutações hereditárias no gene G6PD ligadas ao cromossoma X. A maioria dos indivíduos com esta característica genética são assintomáticos até sofrerem exposição a agentes exógenos que despoletam anemia hemolítica aguda que se pode tornar severa ou até mesmo um risco para a vida [39].

Para além do seu papel importante na produção de pentoses de açúcar necessárias à síntese dos ácidos nucleicos, a G6PD é o principal produtor de NADPH, um dador de eletrões que participa nas reacções de biossíntese dos desoxiribonucleotidos, ácidos gordos e esteroides; é também uma coenzima do citocromo P450. O poder redutor do NADPH é necessário aos desafios oxidativos, algo que ocorre principalmente nos glóbulos vermelhos. Assim, a deficiência de G6PD, o principal fornecedor de NADPH, faz com os glóbulos vermelhos se tornem altamente vulneráveis ao dano oxidativo e, conseqüentemente, suscetíveis à hemólise [39].

**Amostra:** Sangue total.

**Método:** Espectrofotometria ultravioleta.

**Equipamento:** Espectrofotómetro LAMBDA™ 365 UV-Vis, da PerkinElmer.

A técnica utilizada tira partido da redução do NADP pela G6PD na presença de glucose-6-fosfato. A taxa de formação de NADPH é proporcional à atividade da G6PD, e é medida no espetrofotómetro como um aumento da absorvância aos 340 nm [40].



## 2.5 Autoimunidade

O sistema imunitário tem como função primária proteger o hospedeiro de agentes infecciosos, no entanto, este pode tornar-se a causa de patologia quando existe uma síndrome de deficiência ou uma doença autoimune [41].

A autoimunidade pode ser classificada em fisiológica e patológica. A primeira ocorre em indivíduos saudáveis e caracteriza-se por ser transiente, que ocorre a partir do escape de um pequeno número de células T e B autoreativas ao controlo dos mecanismos de tolerância, mas que não causa evidencia clínica de doença. Outro exemplo é a presença de autoanticorpos naturais, como os anticorpos antinucleares e o fator reumatoide, que ajudam a eliminar antigénios endógenos ou outros de origem desconhecida de maneira a manter a homeostase. Por outro lado, quando os autoanticorpos e os linfócitos autoreativos estão envolvidos em processos inflamatórios que resultam em dano dos tecidos, estamos perante autoimunidade patológica [41].

As doenças autoimunes afetam 3-5% da população, sendo as patologias autoimunes da tiroide e a diabetes mellitus tipo I as mais comuns. No entanto, as patologias autoimunes são bastantes variadas e distintas, umas caracterizam-se por ser específicas de órgãos (como a hepatite autoimune) enquanto noutras se verificam disfunções ao nível de vários órgãos (como no lupus eritematoso sistémico) [41].

### 2.5.1 Imunofluorescência Indireta

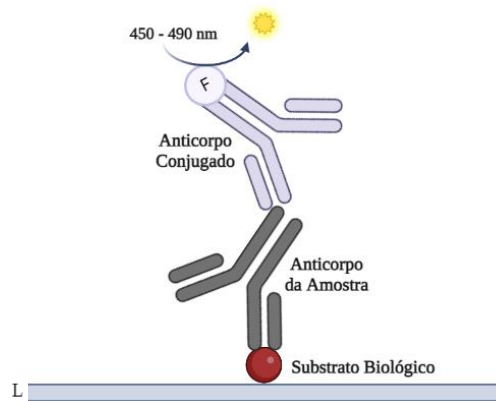
**Amostra:** Soro, plasma ou líquido cefalorraquidiano (LCR).

**Método:** Imunofluorescência indireta.

**Equipamento:** Sprinter XL, da EUROIMMUN e microscópio de imunofluorescência.

Neste *kit* utiliza-se lâminas de vidro onde foram fixados BIOCHIPS. Os BIOCHIPS são fragmentos milimétricos de substratos biológicos, como por exemplo, células, secções de tecidos, células que expressam antigénios ou antigénios purificados. Quando vários BIOCHIPS revestidos com diferentes substratos estão colocados no mesmo campo de reação, é possível investigar o comportamento dos anticorpos contra vários órgãos simultaneamente [42].

Relativamente ao ensaio, existe um primeiro passo de incubação onde os anticorpos da amostra se ligam aos antigénios presentes nos substratos. Para identificar essa ligação, segue-se a adição de um conjugado (anticorpo marcado com fluoresceína) que se liga especificamente aos anticorpos da amostra. Por excitação no microscópio de fluorescência (450-490 nm) é possível visualizar os complexos e, posteriormente, analisar as imagens no *software* EUROLabOffice e assim chegar a um possível diagnóstico de acordo com o padrão visualizado [42].



**Figura 3. Representação esquemática do ensaio de imunofluorescência indireta.**  
F: Fluoresceína; L: Lâmina de vidro. Adaptado de [42]. Imagem criada em biorender.com.

### 2.5.1.1 Diabetes Mellitus

A diabetes mellitus tipo I é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células  $\beta$  produtoras de insulina que se encontram nos ilhéus de Langerhans do pâncreas. Esta destruição ocorre devido à infiltração de autoanticorpos direcionados contra vários antígenos dos ilhéus pancreáticos. Os autoanticorpos considerados mais relevantes são aqueles que reagem contra: a isoforma de 65 kDa da enzima descarboxilase do ácido glutâmico, as proteínas homólogas IA-2 da tirosina fosfatase, o transportador de zinco 8, a insulina e o seu precursor, a pró-insulina [43].

O diagnóstico da diabetes mellitus baseia-se nos seguintes critérios: a) glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dl; ou b) sintomatologia clássica e glicemia ocasional  $\geq 200$  mg/dl; ou c) glicemia  $\geq 200$  mg/dl às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; ou d) hemoglobina glicada A1c (HbA<sub>1c</sub>)  $\geq 6,5\%$  [44].

**Amostra:** Soro ou plasma com EDTA, heparina ou citrato.

**Método:** Imunofluorescência indireta.

**Equipamento:** Manual ou Sprinter XL, da EUROIMMUN e microscópio de imunofluorescência.

O *kit* de lâminas de imunofluorescência indireta fornece uma determinação qualitativa/semi quantitativa dos anticorpos humanos de classe IgG anti-ilhéus pancreáticos e anti descarboxilase do ácido glutâmico, apoiando assim o diagnóstico de diabetes mellitus tipo I. Após incubação da amostra com os campos de teste, se a reação for positiva, os anticorpos específicos vão ligar-se aos antígenos do tecido e tornar-se visíveis num padrão característico.

### 2.5.1.2 Determinação de Anticorpos Antinucleares

Os anticorpos antinucleares (ANA) são marcadores importantes de uma grande variedade de doenças autoimunes, em particulares as doenças reumáticas autoimunes sistêmicas [45]. O ensaio de imunofluorescência indireta em células HEp-2 é considerado o método padrão para a detecção de ANA [46]. Para além de permitir detetar a presença ou ausência de anticorpos, a

imunofluorescência em células HEp-2 dá-nos também informação do título e padrão de fluorescência dos anticorpos [45].

Através de titulações ou por avaliação da intensidade da fluorescência pode determinar-se o título de anticorpos presentes na amostra. Este nível é normalmente bastante relevante uma vez que um alto título de anticorpos está associado a doenças reumáticas e com a identificação de auto antígenos em testes posteriores [45]. Por exemplo, um alto título de anticorpos ANA em conjunto com sintomatologia clínica pode estar associado a lupus eritematoso sistémico (LES), doença mista do tecido conjuntivo (DMTC), entre outras [46].

Por outro lado, o padrão da imunofluorescência pode ser bastante importante uma vez que pode servir de critério de classificação [45]. Por exemplo, o padrão de centrómero está incluído no critério de classificação da esclerose múltipla, mas, por outro lado, o padrão de pontilhado fino denso é aparentemente bastante prevalente em indivíduos saudáveis sendo considerado um dos padrões mais comuns, mas também o menos específico [45,46].

**Amostra:** Soro ou plasma com EDTA, heparina ou citrato.

**Método:** Imunofluorescência indireta.

**Equipamento:** Sprinter XL, da EUROIMMUN e microscópio de imunofluorescência.

Na determinação de anticorpos antinucleares, a preparação das lâminas de imunofluorescência é realizada exclusivamente de forma automática com auxílio do equipamento Sprinter XL. O padrão de fluorescência é posteriormente analisado num microscópio de imunofluorescência.

## 2.6 Calprotectina Fecal

A calprotectina é uma proteína citosólica dos neutrófilos, a sua fonte primária, no entanto, também pode ser derivada dos monócitos e macrófagos. A calprotectina apresenta propriedades antimicrobianas, que se acredita serem resultantes da sua capacidade de quelar metais e sequestrá-los dos patógenos, e apresenta também um papel no sistema imunitário inato [47].

A calprotectina está presente em vários fluidos corporais e sempre em concentração proporcional ao grau de inflamação. Em situações normais, os seus níveis nas fezes são seis vezes mais altos que no plasma, o que a torna num bom biomarcador de inflamação gastrointestinal [47].

A determinação da calprotectina é feita durante os cuidados primários e secundários em utentes que apresentam sintomas abdominais, de modo a auxiliar na diferenciação da doença inflamatória intestinal do síndrome do intestino irritável [48].

**Amostra:** Fezes.

**Método:** Ensaio Imunofluorimétrico.

**Equipamento:** Phadia™ 250, da Thermo Fisher Scientific.

Previamente à realização do ensaio é necessário proceder ao tratamento da amostra de fezes. Este tratamento consiste na extração da calprotectina das amostras de fezes de modo a facilitar a sua determinação no equipamento Phadia™ 250 da Thermo Fisher Scientific [49].

No equipamento existem poços individuais revestidos com anticorpos monoclonais anti-calprotectina e aos quais a calprotectina se liga se estiver presente na amostra do utente. Após este passo de incubação, existe a lavagem dos poços para remoção dos componentes não ligados. De seguida são adicionados anticorpos anti calprotectina marcados enzimaticamente (conjugado). Após incubação, formação dos complexos e remoção do que não se ligou, adiciona-se a solução de desenvolvimento (substrato enzimático). Após o tempo de incubação, a reação é parada e é efetuada a leitura da fluorescência na mistura [50].

O sistema está desenhado para calcular os valores de concentração de calprotectina a partir da curva de calibração previamente estabelecida. O valor da fluorescência tem uma relação diretamente proporcional com a concentração de calprotectina presente na amostra [50].

## 2.7 Análise do Esperma

A infertilidade afeta milhares de pessoas em todo o mundo, estimando-se que um em cada seis casais necessitem de recorrer a técnicas de reprodução medicamente assistida para ter um filho. Em aproximadamente 40% dos casais inférteis, a impossibilidade de ter filhos deve-se a infertilidade masculina [51].

Há evidência de que tem vindo a existir um declínio nas contagens de esperma ao longo dos anos [52], acreditando-se que tal seja causado por mudanças do estilo de vida e do ambiente que têm vindo a ocorrer, como exposição ao tabaco e poluição [53].

A análise do esperma tem assim um papel bastante importante no que diz respeito ao tratamento da infertilidade masculina. O volume de esperma, a concentração de espermatozoides, a percentagem de espermatozoides móveis e a morfologia normal dos mesmos são fatores a ter em consideração na classificação de um indivíduo como fértil, subfértil ou até mesmo infértil [54,55].

### 2.7.1 Espermograma

O espermograma é uma análise feita ao esperma e na qual são avaliadas diversas características, como por exemplo, o volume, o pH, a viscosidade e aparência, e a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides.

Após colheita da amostra de esperma, esta deve ser mantida a uma temperatura de 37 °C para evitar grandes alterações na temperatura que possam vir a afetar os espermatozoides [56]. Deve dar-se início à análise macroscópica e microscópica do sémen após a sua liquefação e entre 30 e 60 minutos após a colheita.

**Amostra:** Esperma.

**Método:** Ensaio de Microscopia Ótica/Análise de Esperma Orientada por Computador.

**Equipamento:** Microscópio de contraste de fase e Sperm Class Analyzer®.

Inicia-se com a determinação do volume aproximado de esperma com auxílio de uma pipeta de plástico graduada, determina-se também o pH através da utilização de tiras de pH e analisa-se a sua aparência e viscosidade, esta última por aspiração da amostra com uma pipeta de plástico e deixando-se cair a mesma por força da gravidade.

O volume de esperma recolhido pode ser indicativo de obstrução ou complicações durante a colheita, quando o volume é baixo. Por outro lado, pode refletir exsudação excessiva em casos de inflamação dos órgãos acessórios, quando o volume é elevado [56].

O pH deve ser determinado o mais rápido possível após a colheita uma vez que o seu valor é influenciado pela perda de CO<sub>2</sub> que ocorre após produção do esperma. Um pH menor que 7 em conjunto com um baixo volume de amostra pode ser indicativo de obstrução. Por outro lado, valores altos de pH podem não ter significado clínico relevante uma vez que o seu valor aumenta ao longo do tempo após a colheita [56].

Uma amostra com viscosidade normal cai da pipeta em pequenas gotas enquanto numa amostra com viscosidade anormal a gota forma um arrastado com mais de 2 cm de comprimento [56].

Um esperma normal apresenta uma aparência homogénea e tem uma cor cinzenta opalescente. No entanto, pode apresentar uma aparência menos opaca se a concentração de espermatozoides for muito baixa, ou pode ter outra cor como avermelhado, se apresentar eritrócitos, ou amarelo, noutras situações [56].

A análise microscópica do esperma é realizada recorrendo a um microscópio de contraste de fase e ao Sperm Class Analyzer<sup>®</sup> (SCA), um software que auxilia na determinação de alguns parâmetros do espermograma como a concentração e a motilidade dos espermatozoides. O SCA deteta automaticamente os espermatozoides, analisando a trajetória e a velocidade daqueles que são móveis [57].

O SCA determina a motilidade e classifica-a em progressiva, não progressiva e imóvel. A motilidade progressiva caracteriza-se pelo movimento dos espermatozoides quer seja linear como em círculo largo, independentemente da velocidade. A motilidade não progressiva classifica todos os outros padrões de mobilidade que tenham abstenção de progressão. Para além disso, o SCA também classifica a velocidade dos espermatozoides como rápida, média, lenta ou imóvel [56,57]. A motilidade progressiva dos espermatozoides está diretamente relacionada com as taxas de gravidez [58,59].

### 2.7.2 Determinação da Taxa de Fragmentação do DNA Espermático

O espermograma é a análise clássica utilizada quando há necessidade de avaliação do esperma e da infertilidade masculina, no entanto existem vários casos em que todos os parâmetros do espermograma se encontram dentro de valores normais mas continua a existir um fator masculino causador de gravidez reduzida ou falhada [60]. A certo ponto, decidiu-se estudar o DNA dos espermatozoides, tendo sido determinado a existência de uma heterogeneidade na sua cromatina. Assim, o DNA espermático foi avaliado no que diz respeito à sua fragmentação, ou seja, a fragmentação das cadeias simples ou duplas do DNA nuclear que resultam numa potencial alteração ou até mesmo perda de material genético [60].

A fragmentação do DNA espermático funciona, no fundo, como um marcador do dano da cromatina, existindo evidência de que este fator apresenta um papel no sucesso reprodutivo e na infertilidade masculina [61].

**Amostra:** Esperma.

**Método:** Dispersão da Cromatina Espermática.

**Equipamento:** Microscópio ótico.

Neste método, os espermatozoides intactos são imersos num microgel de agarose inerte que é depois espalhado numa lâmina.

Primeiro, a amostra é tratada com ácido, o que causa a desnaturação do DNA nas células espermáticas com DNA fragmentado. De seguida, adiciona-se uma solução de lise que remove a maior parte das proteínas nucleares. Por fim, procede-se à desidratação, coloração e visualização no microscópio.

Quando há ausência de fragmentação de DNA, os nucleoides dos espermatozoides com DNA fragmentado mostram um halo de dispersão enquanto aqueles com presença de fragmentação não apresentam halos, ou estes são mínimos [62].

### 3. Core Laboratorial

---

No departamento do core laboratorial realizam-se análises no âmbito da bioquímica clínica, da hematologia, da endocrinologia e da serologia de doenças infecciosas. Deste departamento fazem parte uma área responsável pela hematologia e outra responsável pela bioquímica.

É no core laboratorial onde se realizam as análises de rotina, ou seja, a grande maioria das análises são realizadas de forma automatizada o que permite rentabilizar o tempo de resposta face ao grande volume de amostras que chega ao laboratório.

Depois de terem passado pela triagem, a maioria das amostras que chega ao laboratório são encaminhadas para o core laboratorial onde vão ser submetidas ao sistema pré-analítico.

O sistema pré-analítico é constituído por uma unidade de centrifugação (Cobas<sup>®</sup> p 471 Centrifuge Unit, da Roche), que auxilia a triagem na centrifugação de amostra quando o volume de entrada é elevado, e por um módulo pré-analítico (Cobas<sup>®</sup> p 612 Pre-Analytical System, da Roche), responsável pela análise da qualidade da amostra, criação e etiquetagem de alíquotas e a sua separação conforme o departamento a que se destinam. Esta ação é possível devido à marcação de cada amostra com um código de barras personalizado que confere informação sobre as análises a efetuar na respetiva amostra.

Se o departamento de destino for um dos que constitui o core laboratorial, as amostras são agrupadas em *racks* de acordo com o equipamento a que se destinam e são transportadas de forma automática por meio de uma cadeia (Cobas<sup>®</sup> Connection Modules, da Roche), desde o sistema pré-analítico até ao respetivo analisador automático. Se o departamento de destino se localizar fora do core laboratorial então as amostras são colocadas em suportes que, quando cheios, são removidos pelos técnicos responsáveis pelo sistema pré-analítico e depois encaminhados para o respetivo departamento pelos técnicos da triagem.

As amostras que circulam na cadeia do core laboratorial são direcionadas para o sistema pós-analítico (Cobas<sup>®</sup> p 701 Post-Analytical Unit, da Roche) assim que todas as análises definidas tenham sido realizadas. Este sistema pós-analítico é responsável pelo armazenamento das amostras durante um tempo finito determinado pelo laboratório.

**Período de estágio:** 04/07/2022 – 05/08/2022 (hematologia) e 15/08/2023 – 09/09/2023 (bioquímica).

**Atividades realizadas/acompanhadas:** Processamento de amostras de utentes bem como amostras da AEQ, manutenção de equipamentos, execução e avaliação do CQI, gestão de *stocks*.

#### 3.1 Bioquímica

Na área responsável pela bioquímica realizam-se análises que permitem o estudo dos sistemas metabólicos e da homeostasia dos diversos órgãos, avaliação dos eixos endocrinológicos, monitorização de terapias e pesquisa de substâncias psicoativas.

A área responsável pela bioquímica engloba um sistema de cadeia fechada constituído pelo sistema pré-analítico, o sistema pós-analítico, uma zona de urianálise (Cobas<sup>®</sup> 6500 Urine Analyzer series, da Roche), um analisador de imunoensaios (Cobas<sup>®</sup> e 411 Analyzer, da Roche) e três linhas. Duas linhas (Cobas<sup>®</sup> 8000 Modular Analyzer series, da Roche), cada uma constituída por: um módulo para determinação de ionograma (Cobas<sup>®</sup> 8000 ISE Module, da Roche), dois módulos de bioquímica (Cobas<sup>®</sup> c 702 Module, da Roche) e dois módulos de imunoquímica (Cobas<sup>®</sup> e 801 Analytical Unit, da Roche). E finalmente uma terceira linha constituída por um módulo de bioquímica (Cobas<sup>®</sup> c 502 Module, da Roche) e um módulo de imunoquímica (Cobas<sup>®</sup> e 602 Module, da Roche).

### 3.1.1 Módulo Cobas<sup>®</sup> 8000 ISE

O módulo ISE realiza a determinação da concentração de sódio, potássio e cloreto no soro, plasma ou na urina. Este módulo apresenta três elétrodos seletivos de iões que medem as concentrações dos iões respetivos em relação a um elétrodo de referência. A medição da tensão elétrica entre os elétrodos e o elétrodo de referência permite o cálculo e determinação da concentração de cada ião [63,64].

**Análises:** Ionograma de sódio, potássio e cloreto.

**Amostras:** Soro, plasma e urina.

**Método:** Potenciometria indireta.

Os eletrólitos apresentam um papel bastante importante na manutenção da homeostase, desempenhando funções ao nível da manutenção dos níveis de água, do equilíbrio ácido-base, da função muscular e cardíaca e também funcionam como cofatores de diversas enzimas. A desregulação dos níveis de eletrólitos pode ser a causa ou a consequência de uma variedade de patologias [65].

Os eletrólitos considerados mais importantes fisiologicamente incluem: o sódio, o potássio, o cloreto, o cálcio, o magnésio, o bicarbonato, os fosfatos, o sulfato, entre outros aniões orgânicos. Destes, o sódio, o potássio e o cloreto são aqueles que são doseados mais frequentemente [65].

O sódio é o principal catião do fluido extracelular e tem como função principal a manutenção da distribuição da água e a pressão osmótica no compartimento extracelular [65]. Causas do aumento da concentração de sódio incluem perda excessiva de líquidos, aumento da ingestão de sódio, aumento da reabsorção renal, entre outras [66]. Por outro lado, a diminuição dos níveis de sódio deve-se principalmente devido a vômitos, diarreia, diminuição da reabsorção renal e retenção excessiva de líquidos, entre outras [67].

O potássio é o principal catião do fluido intracelular e tem um papel importante na atividade neurológica e muscular [65,68]. As principais causas do aumento dos níveis de potássio são a diminuição da excreção de potássio pelos rins, aumento da ingestão de potássio, danos nos tecidos, acidose metabólica, entre outras [69]. A diminuição dos níveis de potássio deve-se principalmente à ingestão de diuréticos, distúrbios gastrointestinais que levam à perda excessiva de potássio (vômitos, diarreia), redução da ingestão ou aumento da excreção renal [70].

O cloreto é o principal anião do fluído extracelular e é responsável pela regulação e manutenção da distribuição da água, da pressão osmótica e do equilíbrio entre os aniões e cationes no compartimento extracelular [65]. As causas mais comuns de diminuição do cloreto incluem perda gastrointestinal (como vômitos), perda renal, redução da ingestão, entre outras. Um aumento dos níveis de cloreto verifica-se em casos de desidratação severa, insuficiência renal, em casos de acidose, entre outras. [71].

### 3.1.2 Módulo Cobas® c 702

O módulo c 702 utiliza fotometria para determinar a concentração de uma enorme variedade de analitos. Este utiliza uma lâmpada que faz passar um feixe de luz através da amostra, depois, a partir da medição da absorvância do analito a determinar, o equipamento efetua os cálculos da concentração do analito a partir de uma curva de calibração. A maioria dos testes utiliza duas leituras de comprimento de onda diferentes, uma vez que a diferença entre as duas leituras permite eliminar interferências e ruído fotométrico [63].

**Análises:** Marcadores cardíacos, endócrinos, hematológicos, oncológicos, hepáticos, urológicos, pulmonares, entre outros.

**Amostras:** Soro, plasma, LCR e urina.

**Método:** Fotometria.

#### 3.1.2.1 Determinação Quantitativa da Creatinina Cinase

A creatina cinase (CK) é uma guanidina cinase de aproximadamente 40 kDa que tem como principal função auxiliar na hidrólise do ATP. A CK só é funcionalmente ativa quando está na forma dimérica e encontra-se principalmente presente em tecidos que necessitam de níveis energéticos elevados como o cérebro e os músculos. A CK citosólica tem três isoenzimas distintas: uma isoenzima do tipo cerebral (CK-BB), uma do tipo miocárdica (CK-MB) e uma característica do musculo esquelético (CK-MM). Para além destas, existe ainda uma isoenzima mitocondrial (Mt-CK) [72].

A determinação da CK é o teste de preferência nos casos em que há suspeita de dano muscular. Verifica-se um aumento dos níveis de CK no soro na maioria dos utentes com danos, inflamação ou necrose do músculo esquelético ou cardíaco [65].

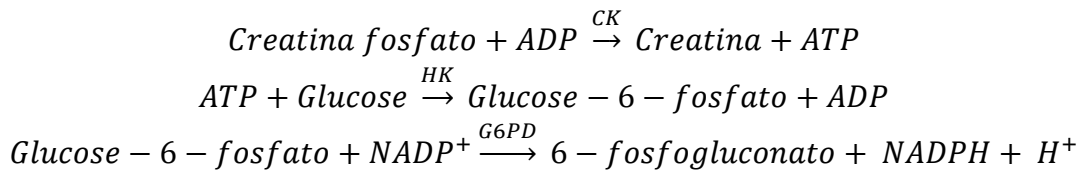
**Análise:** Creatina cinase total.

**Amostras:** Soro e plasma heparinado.

**Método:** Fotometria.

Este método baseia-se na capacidade que a creatina cinase apresenta de catalisar a conversão da creatina fosfato em creatina com a consequente fosforilação do ADP em ATP. O ATP produzido é medido via duas reações acopladas catalisadas pela hexocinase (HK) e pela glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A primeira catalisa a conversão da glucose em glucose-6-fosfato com a conversão de ATP em ADP e a segunda catalisa a conversão da

glucose-6-fosfato em 6-fosfogluconato com conversão de  $\text{NADP}^+$  em  $\text{NADPH}$ . Formam-se quantidades equimolares de  $\text{NADPH}$  e  $\text{ATP}$  à mesma velocidade, pelo que, a formação de  $\text{NADPH}$  medida espectroscopicamente a 340 nm é diretamente proporcional à atividade da CK [65].



### 3.1.2.2 Determinação Quantitativa das Aminotransferases

As aminotransferases são parte de um grupo de enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos em ácidos 2-oxo por transferência de um grupo amina. A aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) são duas das aminotransferases que apresentam maior interesse clínico. As aminotransferases estão distribuídas pelo organismo: a AST é mais frequentemente encontrada no coração, fígado, músculo esquelético e rins, enquanto a ALT é mais predominante no fígado e rins. Para além disso, ao passo que a ALT é exclusiva do citoplasma, a AST apresenta tanto uma forma citoplasmática como uma mitocondrial [65].

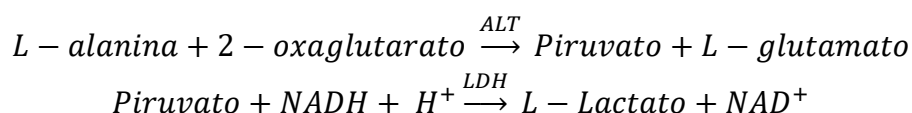
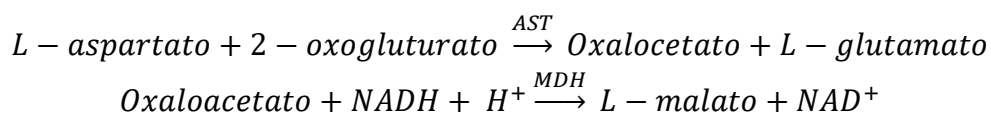
A causa mais importante do aumento da atividade das transaminases no soro é a doença hepática. Tanto a atividade da AST como da ALT podem aumentar em casos em que a integridade das células do fígado é afetada, no entanto, das duas enzimas a ALT é a considerada um marcador mais específico do fígado uma vez que, ao contrário da AST, apresenta uma atividade predominante no fígado [65].

**Análise:** Determinação quantitativa da AST e da ALT.

**Amostras:** Soro e plasma heparinado.

**Método:** Fotometria.

A determinação da atividade da AST e da ALT baseia-se na capacidade que estas enzimas apresentam para catalisar a transferência de um grupo amina entre o L-aspartato ou a L-alanina, respetivamente, e o 2-oxoglutarato. Ambas as reações conduzem à produção de piruvato que é depois reduzido pelo  $\text{NADH}$  numa reação catalisada pelo malato desidrogenase (MDH) ou pela lactato desidrogenase (LDH), com formação de L-malato ou L-lactato e  $\text{NAD}^+$ , respetivamente. A taxa de oxidação do  $\text{NADH}$  é diretamente proporcional à atividade das enzimas, que é determinada através da medição da diminuição da absorvância [73,74].



### 3.1.2.3 Determinação Quantitativa da $\alpha$ 1-Microglobulina

A  $\alpha$ 1-microglobulina, também conhecida por proteína HC, é uma glicoproteína plasmática de 26 kDa que pertence à superfamília das lipocalinas [75,76]. A  $\alpha$ 1-microglobulina está principalmente distribuída no fígado, sangue e rins, ou seja, os locais onde ocorre o seu metabolismo [75]. A síntese da  $\alpha$ 1-microglobulina ocorre nos hepatócitos do fígado, sendo depois secretada para o sangue onde existe não só na sua forma livre, mas também numa variedade de complexos. A  $\alpha$ 1-microglobulina livre passa livremente pelas membranas glomerulares até à urina primária, de onde volta a ser reabsorvida pelas células dos túbulos proximais, onde a proteína vai sofrer catabolização [75].

É possível encontrar quantidades significativas de  $\alpha$ 1-microglobulina livre na urina normal, pelo que a sua concentração é um indicador de desordens ao nível da função tubular renal [75]. Em situações em que existe uma perturbação da função tubular a reabsorção da  $\alpha$ 1-microglobulina está diminuída, verificando-se um aumento da concentração desta proteína na urina [75].

O impacto da função tubular na concentração urinária da  $\alpha$ 1-microglobulina em conjunto com a sua elevada estabilidade na urina, tornam-na num marcador ideal das patologias tubulares renais [75].

**Análise:** Determinação quantitativa da  $\alpha$ 1-microglobulina.

**Amostras:** Urina.

**Método:** Nefelometria.

Neste ensaio, os anticorpos anti  $\alpha$ 1-microglobulina, que se encontram na superfície de partículas de látex, reagem com a  $\alpha$ 1-microglobulina presente na amostra formando complexos antigénio/anticorpo. Após aglutinação, os complexos formados podem ser determinados turbidimetricamente como uma alteração da absorvância, sendo a magnitude da alteração proporcional à quantidade de  $\alpha$ 1-microglobulina presente na amostra. A concentração real é depois determinada a partir de uma curva de calibração que foi previamente preparada a partir de calibradores com concentrações conhecidas do analito [77].

### 3.1.3 Módulo Cobas® e 801

O módulo e 801 utiliza tecnologia de eletroquimioluminescência (ECL) na realização de uma variedade de imunoensaios. Nesta tecnologia a amostra é incubada com dois anticorpos específicos para o analito a testar, um anticorpo marcado com biotina e um segundo anticorpo marcado com ruténio. Após formação do complexo, são adicionadas à mistura microesferas revestidas com estreptavidina, que formam uma ligação com a biotina.

A mistura é de seguida transferida para a célula de medição, onde pela ação de um íman existe a deposição das microesferas revestidas com os complexos de antigénios e anticorpos. De seguida, introduz-se um tampão no sistema, que para além de fornecer tripropilamina (TPA), também remove da célula de medição todos os reagentes não ligados e outros constituintes da amostra sem interesse para a análise.

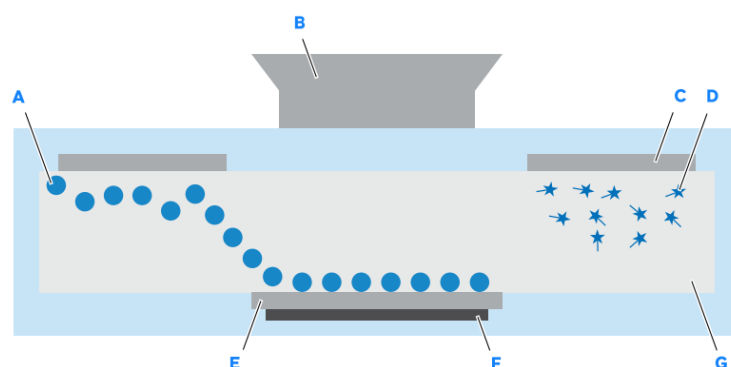
Após remoção do íman, é aplicada tensão no eletrodo de platina, na superfície do qual ocorre a reação de ECL. Primeiramente, dá-se a oxidação da TPA no eletrodo, ocorrendo a libertação de um elétron e a formação de um cátion radical que reage libertando um próton resultando na formação de um radical de TPA. Entretanto, o complexo de rutênio também sofre oxidação com a libertação de um elétron e formação de um cátion de rutênio. Este cátion e o radical TPA reagem um com o outro resultando na redução do cátion de rutênio e na formação de um estado excitado desta nova espécie reduzida. Devido à instabilidade deste estado excitado, este dissipa-se com a emissão de um fóton a 620 nm para o estado fundamental.

Esta emissão de luz por parte dos complexos é medida por um fotomultiplicador que converte o sinal de ECL para um sinal elétrico a partir do qual o aparelho calcula o resultado [63].

**Análises:** Marcadores cardíacos, dermatológicos, endócrinos, gastroenterológicos, ginecológicos, entre outros.

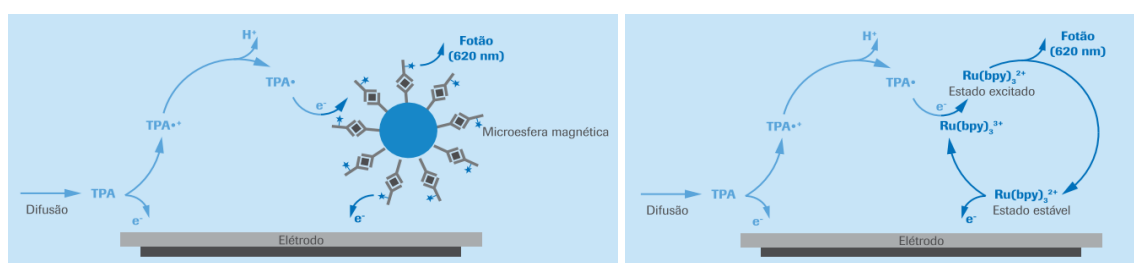
**Amostras:** Soro, plasma e urina.

**Método:** Eletroquimioluminescência.



**Figura 4. Representação esquemática da célula de medição de ECL.**

A: Microesferas magnéticas ligadas a complexos anticorpos/antígeno; B: Fotomultiplicador; C: Contraeletrodo; D: Anticorpo marcado com rutênio; E: Eletrodo de trabalho; F: Íman; G: Canal de fluxo. Retirado de [63].



**Figura 5. Representação esquemática da reação de ECL.**

Ru(bpy): Complexo de rutênio. Retirado de [63].

### 3.1.3.1 Determinação Quantitativa e Qualitativa de IgG/IgM Anti-Citomegalovirus e Aidez

O citomegalovirus (CMV) é um vírus da família dos herpesvirus que, como os demais membros desta família, é responsável por causar uma infecção latente que dura toda a vida do

hospedeiro após ter ocorrido a infecção primária. Esta infecção latente pode ser reativada periodicamente com disseminação do vírus [78].

O CMV transmite-se através dos fluidos corporais como o sangue, secreções genitais e leite materno. A saliva e a urina de indivíduos infetados também podem servir como fonte de disseminação do vírus, principalmente em crianças [79].

A infecção primária em indivíduos imunocompetentes geralmente caracteriza-se por sintomatologia ligeira ou até mesmo assintomática. Os sintomas característicos são febre, dor de garganta, fadiga e inchaço das glândulas. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, a infecção por CMV pode causar problemas mais graves ao nível dos olhos, pulmões, fígado, esófago, estômago e intestino [80].

O CMV é também uma das causas mais comuns de infecção congénita. A maioria dos recém-nascidos com infecção congénita por CMV não apresentam sinais nem sintomas de infecção, no entanto, alguns apresentam problemas de saúde logo à nascença ou então desenvolvem-nos mais tarde [80]. As características clínicas comuns da infecção congénita por CMV incluem icterícia, hepatoesplenomegalia, prematuridade, restrição de crescimento intrauterino, microcefalia, trombocitopenia e manifestações cutâneas como petéquias e púrpura [81]. Para além disso, alguns recém-nascidos podem apresentar problemas de saúde a longo termo como perda de audição, atraso motor e no desenvolvimento, perda de visão, microcefalia e convulsões [80].

O diagnóstico da infecção primária aguda por CMV é normalmente feito através da deteção das imunoglobulinas IgG e IgM específicas. As amostras reativas para IgM indicam uma infecção aguda recente quer primária ou por reativação. É também frequente a determinação da avidéz das IgG, uma vez que auxilia a classificação de uma infecção primária [79].

**Análises:** Determinação quantitativa e qualitativa de IgG/IgM anti-citomegalovirus e avidéz.

**Amostras:** Soro e plasma.

**Método:** Eletroquimioluminescência.

### 3.1.3.2 Determinação Quantitativa da Interleucina-6

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica com um variado leque de funções biológicas na regulação da imunidade, hematopoiese, inflamação e oncogénese. Diversos estudos mostram que a IL-6, para além de apresentar atividade estimuladora das células B, também apresenta atividade em células T, células estaminais, hepatócitos e células cerebrais [82].

A produção de IL-6 por células linfóides e não linfóides é induzida durante reações inflamatórias agudas associadas a ferimento, traumatismos, stress, infeções, neoplasias, entre outras situações [83].

Concentrações elevadas no período pós-operatório ou em doentes em estado crítico podem ser indicativos da magnitude da resposta inflamatória, fornecendo informação sobre alguns dos mecanismos responsáveis pela resposta exagerada e possíveis desfechos, que incluem disfunção dos órgãos e mortalidade [84]. A determinação sequencial de IL-6 no soro ou plasma de doentes

internados na unidade de cuidados intensivos mostrou-se útil na avaliação da gravidade do síndrome de resposta inflamatória sistêmica, da sépsis e do choque séptico e para prever o valor prognóstico [84]. Para além disso, os níveis de IL-6 apresentam-se elevados em doenças inflamatórias e apresenta um papel importante no desenvolvimento da inflamação crónica [85].

**Análises:** Determinação quantitativa de IL-6.

**Amostras:** Soro e plasma.

**Método:** Eletroquimioluminescência.

### 3.1.4 Módulo Cobas® c 502

O módulo c 502 utiliza fotometria, à semelhança do módulo c 702, para determinação qualitativa e quantitativa de um variado espectro de analitos [63].

**Análises:** Marcadores cardíacos, endócrinos, hematológicos, oncológicos, hepáticos, urológicos, pulmonares, entre outros.

**Amostras:** Soro, plasma, sague total, LCR e urina.

**Método:** Fotometria.

#### 3.1.4.1 Determinação Quantitativa da Glicoproteína $\alpha$ 1-Ácida

A glicoproteína  $\alpha$ 1-ácida, também denominada de orosomucoide, é uma proteína de fase aguda não específica sintetizada nos hepatócitos [86]. É considerada um anti-inflamatório natural e um modulador do sistema imunitário, pelo que níveis elevados desta proteína podem limitar a inflamação ao atuar como um mecanismo de *feedback* negativo [86]. A concentração da glicoproteína  $\alpha$ 1-ácida duplica após trauma cirúrgico, em condições inflamatórias como artrite reumatoide e em alguns tipos de cancro como o dos pulmões e o da mama [86,87].

**Análises:** Determinação quantitativa da glicoproteína  $\alpha$ 1-ácida.

**Amostras:** Soro e plasma.

**Método:** Imunoturbidimetria.

Neste ensaio, anticorpos anti glicoproteína  $\alpha$ 1-ácida reagem com o antígeno presente na amostra formando complexos antígeno/anticorpo. Após aglutinação dos complexos, estes são medidos turbidimetricamente. A turbidez determinada está diretamente relacionada com a concentração de glicoproteína  $\alpha$ 1-ácida [88].

### 3.1.5 Módulo Cobas® e 602

O módulo e 602 é um analisador imunológico que utiliza, assim como o módulo e 801, tecnologia de ECL para a determinação de um grande leque de testes quantitativos e qualitativos [63].

**Análises:** Marcadores cardíacos, dermatológicos, endócrinos, gastroenterológicos, ginecológicos, hepáticos, oncológicos, de doenças infecciosas, entre outros.

**Amostras:** Soro, plasma e urina.

**Método:** Eletroquimioluminescência.

### 3.1.5.1 Determinação Quantitativa da $\beta$ hCG Livre

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma hormona glicoproteica que participa na regulação, desenvolvimento e manutenção da gravidez. É produzida nos trofoblastos e é responsável por processos como a implantação, placentação, angiogénese, desenvolvimento do feto e tolerância imunitária [89].

A hCG está presente apenas no sangue e na urina de pessoas grávidas. Numa gravidez saudável, a hCG apresenta um aumento inicial seguido de um período de diminuição compreendido entre a 10<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semanas de gestação [90].

Variações nos níveis desta hormona podem ser indicativos de algumas condições patológicas como: interrupção da gravidez, doença trofoblástica gestacional, coriocarcinoma, malignidades das células gestacionais e tumores não trofoblásticos de várias origens [89].

O aumento dos níveis de hCG em combinação com a diminuição dos níveis de proteína A plasmática associada à gravidez e a determinação de translucência nucal por ultrassom possibilita a identificação de um feto com elevado risco de ser afetado por aneuploidias, nomeadamente trissomia 21, durante o primeiro trimestre da gravidez [91].

**Análises:** Determinação quantitativa da  $\beta$ hCG livre.

**Amostras:** Soro.

**Método:** Eletroquimioluminescência.

### 3.1.6 Série de Analisadores da Urina: Cobas® 6500

A série de analisadores da urina Cobas® 6500 é um sistema de urianálise automático que integra dois módulos de analisadores: o Cobas® u 601 Urine Analyzer e o Cobas® u 701 Microscopy Analyzer.

O módulo u 601, também denominado analisador de tiras teste, destina-se à determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa *in vitro* de analitos na urina. Alguns dos analitos e parâmetros determinados incluem o pH, leucócitos, eritrócitos, nitritos, proteínas, glucose, cetonas, urobilinogénio, cor e aspeto.

O módulo u 701, também denominado de analisador de microscopia, efetua a determinação quantitativa *in vitro* de eritrócitos e leucócitos, a determinação semiquantitativa de células epiteliais, bactérias e cilindros hialinos, e ainda, determina qualitativamente cilindros patológicos, cristais, leveduras, muco e esperma na urina.

**Análises:** Contagem dos elementos presentes na urina (Cobas® u 601) e análise microscópica do sedimento urinário (Cobas® u 701)

**Amostras:** Urina.

**Método:** Tiras teste e microscopia ótica.

### 3.1.6.1 pH

O pH da urina pode variar entre 4,5 e 8, no entanto a maioria dos utentes apresenta uma urina ligeiramente ácida. A urina ácida pode ser observada em utentes com uma dieta rica em proteína, em casos de acidose metabólica e respiratória ou durante a toma de alguns medicamentos. A urina alcalina pode ser observada em utentes com uma dieta vegetariana, em casos de alcalose metabólica e respiratória e acidose tubular renal e na toma de alguns medicamentos [92].

A tira teste contém vermelho metileno, fenolftaleína e azul de bromotimol e reage especificamente com os iões  $H^+$  presentes na amostra [93].

### 3.1.6.2 Leucócitos

Os leucócitos não aparecem normalmente na urina pelo que a sua presença pode ser indicativa de uma inflamação, normalmente associada a uma infeção do trato urinário [92].

Este teste revela a presença de esterases de leucócitos, uma enzima presente nos granulócitos que tem sido utilizada como indicador da presença de células inflamatórias em tecidos e amostras [93,94]. A tira teste contém um éster de indoxil que sofre clivagem pela esterase com libertação de indoxil que, conseqüentemente, reage com um sal de diazonio e produz um corante violeta [93].

### 3.1.6.3 Nitrito

Normalmente, o nitrato é o analito que é excretado na urina, no entanto, a presença de alguns organismos com a capacidade de reduzir o nitrato a nitrito faz com que o nitrato seja reduzido a nitrito antes que este seja excretado na urina. Entre os microrganismos com esta capacidade, encontram-se alguns patógenos comuns como a *E. coli*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Klebsiella* [92].

O teste do nitrito é um método barato e rápido que permite a testagem de infeções do trato urinário, no entanto, não deve substituir o teste microbiológico urinário [92].

O teste baseia-se no princípio do teste de Griss, revelando a presença de nitrito quando existe alteração da tira teste para rosa/vermelho [93].

### 3.1.6.4 Proteínas

As proteínas estão normalmente presentes apenas em pequenas quantidades na urina. Após passagem através glomérulos, a maioria das proteínas plasmáticas mais pequenas é reabsorvida. A excreção da albumina em indivíduos saudáveis é de aproximadamente 30 mg por dia. Um aumento da excreção de albumina, ao qual se dá o nome de microalbuminúria, é definido como a excreção de 30 a 300 mg de albumina por dia na urina. A microalbuminúria pode servir como um indicador do dano glomerular e risco de progressão de doença renal, em particular associada a diabetes mellitus [92].

O teste baseia-se no facto de que a um pH fixo, as proteínas funcionam como aceitadores de iões hidrogénio, o que causa a mudança de cor de alguns indicadores. O teste é particularmente sensível à albumina [92,93].

#### 3.1.6.5 Glucose

A glucose é um metabolito que é filtrado livremente pela membrana glomerular e que é depois reabsorvida a nível tubular quase na sua totalidade, no entanto, em condições saudáveis esta pode ser encontrada na urina em pequenas quantidades [92].

Normalmente, a deteção de glucose na urina é normalmente detetada quando os níveis de glicemia são superiores a 180 mg/dL, valor que excede a capacidade de reabsorção tubular. Para além da diabetes mellitus, a glicosúria pode ser detetada em patologias que afetem o sistema nervoso central, os rins, o sistema endócrino, o fígado, entre outras [92].

O teste baseia-se na reação da glucose oxidase e da peroxidase. A glucose oxidase converte a glucose em ácido glicónico com produção de peróxido de hidrogénio, o qual, via reação catalisada pela peroxidase, oxida o cromogéneo [92,93].

#### 3.1.6.6 Corpos Cetónicos

Os corpos cetónicos são um produto resultante do metabolismo incompleto das gorduras e são indicativos de um estado metabólico de gliconeogénese que pode acontecer em situações de fome, dieta pobre em carboidratos, doença febril ou em caso de diabetes mellitus descontrolado [92].

O ácido acetoacético, a acetona e o ácido  $\beta$ -hidroxibutírico são alguns dos corpos cetónicos libertados pelo fígado para a corrente sanguínea e que são depois utilizados por outros tecidos para a produção de energia. Naturalmente, alguns dos corpos cetónicos libertados são filtrados nos rins e excretados na urina [92].

O teste tira partido da reação do nitroprussiato na qual o nitroferrocianeto de sódio e a glicina reagem com os corpos cetónicos em pH alcalino para produzir um produto de cor violeta. A reação é mais sensível ao ácido acetoacético do que à acetona [92,93].

#### 3.1.6.7 Bilirrubina

A bilirrubina é um produto da senescência dos glóbulos vermelhos no sistema reticuloendotelial e é principalmente excretada no fígado, sob a sua forma conjugada, na bÍlis. No intestino delgado a bilirrubina é convertida novamente à sua forma não conjugada e depois reduzida a urobilinogénio pela flora intestinal. Cerca de vinte por cento do urobilinogénio formado é reabsorvido e enviado para o fígado onde vai ser excretado para a vesícula biliar. Uma pequena quantidade continua na corrente sanguínea e é excretada nos rins [92].

A presença de bilirrubina na urina é indicativa de disfunções hepáticas e obstrução biliar intrínseca ou extrínseca, entre outras patologias [92].

O teste é baseado na reação de acoplamento da bilirrubina com um sal de diazónio, o que gera a produção de uma coloração rosa [93].

### 3.1.6.8 Urobilinogénio

O urobilinogénio é um produto do metabolismo da bilirrubina realizado por bactérias intestinais. A maioria do urobilinogénio é eliminado nas fezes, algum é reabsorvido e direcionado para o fígado onde volta a ser excretado na bÍlis. Se presente em excesso, o urobilinogénio remanescente é filtrado pelos rins e eliminado na urina [92].

IndivÍduos que sofram de disfunções severas do fÍgado como cirrose ou hepatite não conseguem reabsorver o urobilinogénio, pelo que apresentam valores elevados deste tanto no soro como na urina [92].

Neste teste, um sal de diazónio reage com o urobilinogénio resultando na formação de um corante vermelho [93].

### 3.1.6.9 Sangue

A urina de indivÍduos saudáveis apresenta, aproximadamente, cinco glóbulos vermelhos por microlitro, uma quantidade tão pequena que não é detetada na tira teste. A hematúria acontece normalmente como resultado de sangramento do sistema urinário, desde os glomérulos até à uretra. Entre as causas de sangramento inclui-se tumores dos rins e da bexiga, trauma renal, glomerulonefrite, pielonefrite, cálculos renais e distúrbios hemorrágicos relacionados com o uso de anticoagulantes. A hematúria pode ainda ser um resultado da lise dos glóbulos vermelhos no trato urinário [92].

Este teste utiliza a capacidade que a hemoglobina apresenta de catalisar a reação de oxidação de um indicador por via do peróxido orgânico contido na tira teste. Uma reação positiva apresenta uma coloração azul-esverdeada [93].

### 3.1.6.10 Cor

A coloração amarela da urina de indivÍduos saudáveis é devida à presença de um pigmento natural, a urobilina. A cor da urina pode variar entre indivÍduos e está dependente do estado de hidratação, dieta, medicação, entre outros [92].

Urina de cor vermelha caracteriza-se pela presença de hemoglobina, glóbulos vermelhos, mioglobina, porfirina, fuscina, consumo de beterraba ou pode acontecer devido a contaminação menstrual. A urina de cor preta está associada à presença de ácido homogentísico, melanina ou meta-hemoglobina. Urina verde é característica de infeções por *Pseudomonas* ou na presença de indicana ou clorofila. Uma urina de cor azul ou roxa é indicativo de excesso de porfirinas [92].

### 3.1.6.11 Cristais

Devido ao papel dos rins na excreção metabólica e na manutenção da homeostase, os produtos finais do metabolismo são encontrados em concentrações altas, o que pode proporcionar a sua precipitação e a formação de cristais. Embora encontrar cristais no

sedimento urinário não esteja necessariamente associado a estados patológicos, alguns tipos de cristais anormais estão associados a doença [92].

Os cristais de leucina e tirosina estão associados a doença hepática grave, enquanto os cristais de colesterol são observados na síndrome nefrótica e na doença renal poliquística. Os cristais de ácido úrico, oxalato de cálcio e de fosfato amorfo são comumente observados em amostras normais [92].

#### 3.1.6.12 Leucócitos

A presença de um número aumentado de glóbulos brancos na urina é indicativa de um estado inflamatório, que normalmente está associado a uma infecção do trato urinário [92]

#### 3.1.6.13 Células Epiteliais

Os três tipos de células epiteliais mais frequentemente observadas no sedimento urinário são as células tubulares renais, transicionais e as escamosas.

O epitélio dos túbulos renais sofre constantemente um processo de renovação e, como resultado, é normal encontrar algumas dessas células no sedimento urinário. No entanto, o aumento do número dessas células é indicativo de dano tubular renal que pode resultar de necrose tubular renal, envenenamento por metais pesados, infecção por citomegalovírus, transplante renal ou trombose da veia renal.

Tal como o epitélio dos túbulos renais, também o epitélio de transição apresenta uma alta taxa de renovação. O aumento do número dessas células na urina é observado em certas condições inflamatórias que afetam o trato urinário como os carcinomas da bexiga.

Numa amostra que tenha sido devidamente colhida, deve-se observar um baixo número de células epiteliais escamosas, uma vez que a contaminação com conteúdo vaginal é a razão mais comum para valores elevado [92].

#### 3.1.6.14 Cilindros

Os cilindros são formados quando o conteúdo dentro dos túbulos renais solidifica e passa para a urina. Esse processo de solidificação pode ser resultado do aumento da concentração ou do aumento da filtração de certas proteínas, bem como da presença anormal de diferentes tipos de células ou compostos. Os cilindros assumem a forma do túbulo renal no qual são formados, pelo que, um exame cuidadoso pode fornecer informações sobre o estado do rim.

Existem dois tipos de cilindros que aparecem normalmente no sedimento urinário: cilindros hialinos e cilindros finamente granulares. Em condições patológicas também é possível observar a formação de cilindros através de eritrócitos, leucócitos, sangue, células epiteliais tubulares renais, bactérias e fungos [92].

### 3.1.6.15 Microrganismos

Amostras em que se detete a presença de bactérias, fungos, parasitas ou células infetadas por vírus devem ser acompanhadas por microbiologia para confirmação e classificação do patógeno [92].

## 3.2 Hematologia

Na área responsável pela hematologia faz-se o estudo dos elementos figurados do sangue, da hemostase, trombofilia e fibrinólise. Para além disso, realiza-se a determinação dos grupos sanguíneos e faz-se a identificação e quantificação dos anticorpos contra antígenos eritrocitários de elevada prevalência.

Como mencionado anteriormente, a hematologia também faz parte do core laboratorial. Assim, à semelhança do que acontece na bioquímica, a maioria das análises efetuadas no laboratório de hematologia são realizadas com recurso a equipamentos automáticos estando estes também ligados ao sistema de cadeia fechada que existe no core laboratorial.

Os equipamentos que fazem parte da área responsável pela hematologia são: os analisadores hematológicos automáticos (XN-1000™, Sysmex), sistema de realização automática de esfregaços de sangue (SP-10, Sysmex), analisadores da coagulação (STA R Max, Stago), analisador da velocidade de sedimentação (Starrsed Interliner XN, Sysmex), analisador da hemoglobina glicada (Cobas® c 513, Roche), analisadores dos grupos sanguíneos (ORTHO VISION®, Ortho Clinical Diagnostics) e, por fim, um equipamento responsável pelo arquivo dos tubos de amostras (TS-10, Sysmex).

### 3.2.1 Hemograma

O hemograma é a análise mais requisitada no laboratório de hematologia. Esta análise inclui a medição, contagem e estudo das células do sangue, como os eritrócitos, leucócitos, plaquetas bem como a velocidade de sedimentação. Estes são alguns parâmetros principais que guiam o médico no diagnóstico diferencial do utente [95].

**Amostra:** Sangue total.

**Método:** Sulfato lauril de sódio livre de cianeto (SLS), citometria de fluxo fluorescente e impedância com foco hidrodinâmico.

**Equipamento:** XN-1000™, da Sysmex.

#### 3.2.1.1 Eritrócitos

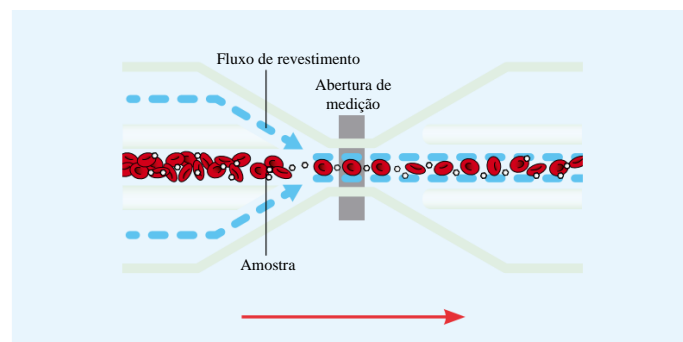
A contagem dos eritrócitos pode servir de guia no diagnóstico de patologias do foro sanguíneo [96]. As anemias são a patologia mais comumente associada à alteração do número de eritrócitos [97].

Uma diminuição do número de eritrócitos está principalmente associada a anemias, no entanto também pode indicar algum tipo de deficiências nutricionais como, por exemplo, deficiência da vitamina B6, B12 ou de folatos, problemas renais ou até hemorragia interna [96]. No caso de um aumento dos níveis de eritrócitos, este pode estar associado a condições de saúde como doença congênita do coração, policitemia, desidratação, hipoxia, entre outras [96].

**Método:** Impedância com foco hidrodinâmico.

O equipamento aspira uma porção do sangue total e mistura-a com um diluente. Uma quantidade definida dessa porção é enviada para a câmara de detecção e passa por uma abertura onde se situa um eletrodo em cada um dos seus lados [98].

Esta tecnologia baseia-se no princípio de que um campo elétrico, criado entre dois eletrodos de carga oposta, pode ser usado para contar e determinar o tamanho das células. As células sanguíneas são más condutoras da eletricidade e o diluente no qual estas são suspensas é uma solução isotônica que é um bom condutor da eletricidade. Assim, quando as células suspensas no diluente passam pela abertura entre os dois eletrodos, cada célula individual aumentará momentaneamente a impedância (resistência) do circuito elétrico entre os eletrodos. Cada célula vai então gerar um pulso elétrico proporcional ao seu tamanho [99].



**Figura 6. Representação esquemática do princípio da impedância com foco hidrodinâmico.** Adaptado de [99].

### 3.2.1.2 Hemoglobina

A concentração de hemoglobina (Hb) é medida no sangue total e o seu valor expresso em g/dL [65]. A determinação da concentração de hemoglobina é um importante parâmetro no diagnóstico da anemia [100] quando se encontra a baixas concentrações. Já um valor elevado de hemoglobina pode estar associado a desidratação, policitemia reativa ou neoplásica [65].

**Método:** SLS.

O analisador automático utiliza um método no qual todas as formas de hemoglobina presentes na amostra são convertidas a cianometemoglobina após lise celular. A absorvância da cianometemoglobina pode ser medida a 540 nm e é proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra [65,101].

### 3.2.1.3 Hematócrito

O hematócrito (Ht) é o volume relativo ocupado pelos eritrócitos num determinado volume de sangue total (%) [100]. Um hematócrito diminuído pode ser encontrado em situações de anemia, já um aumento do hematócrito é característico de policitêmia tanto reativa como neoplásica [65].

### 3.2.1.4 Volume Globular Médio

O volume globular médio (VGM) corresponde ao volume médio dos eritrócitos e é expresso em fentolitros (fL) [100]. O VGM serve de base para a classificação das anemias relativamente ao tamanho dos eritrócitos. Uma anemia com um VGM aumentado é classificada como anemia macrocítica; uma anemia com um VGM dentro dos valores de referência classifica-se como anemia normocítica; por fim, uma anemia com um VGM baixo classifica-se como anemia microcítica. Esta classificação pode facilitar a determinação da etiologia de algumas anemias, no entanto algumas podem manifestar-se em mais do que uma forma [65].

O VGM pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$VGM (fL) = \frac{Ht (L/L)}{GV (x10^{12}/L)}$$

### 3.2.1.5 Hemoglobina Globular Média

A hemoglobina globular média (HGM) corresponde ao peso médio de hemoglobina contido num eritrócito e é expressa em picogramas. A HGM é diretamente proporcional à quantidade de hemoglobina e ao tamanho dos eritrócitos [95].

A HGM pode ser calculada a partir da seguinte fórmula:

$$HGM(pg) = \frac{Hb (g/dL) \times 10}{GV (x10^{12}/L)}$$

### 3.2.1.6 Concentração de Hemoglobina Globular Média

A concentração de hemoglobina globular média (CHGM) corresponde à concentração média de hemoglobina por unidade de volume de eritrócitos e é expressa em g/dL. Um valor diminuído de CHGM permite classificar os eritrócitos como hipocrómicos, normalmente associado a deficiência de ferro. Um valor aumentado de CHGM está associado a esferocitose (ou seja, aumento dos esferócitos), uma característica de patologias como a esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune e anemia falciforme [65].

A CHGM pode ser calculada a partir da seguinte fórmula:

$$CHGM (g/dL) = \frac{Hb (g/dL)}{Ht (L/L)}$$

### 3.2.1.7 Coeficiente de Dispersão do Volume Eritrocitário

O coeficiente de dispersão do volume eritrocitário (RDW) corresponde ao coeficiente de variação de distribuição do volume eritrocitário. É um parâmetro calculado por contadores automáticos e pode ser expresso tanto em percentagem (%) como em fentolitros (fL). O RDW reflete o grau de anisocitose dos eritrócitos. Um elevado grau de anisocitose é característico de anemia por deficiência de ferro [65].

### 3.2.2 Esfregaço de Sangue

O esfregaço de sangue periférico caracteriza-se por ser uma preparação de uma camada de células sanguíneas numa lâmina de vidro que tem como finalidade ser examinada ao microscópio após coloração. A partir do esfregaço de sangue é possível tirar conclusões como: a morfologia dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas; estabelecer a fórmula leucocitária (percentagem de cada tipo de leucócito presente naquela amostra de sangue); realizar a contagem de plaquetas.

O exame do esfregaço de sangue periférico era considerado uma parte integral do hemograma uma vez que era a partir deste que se realizava a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e se determinava os índices eritrocitários. No entanto, a automatização do laboratório de hematologia veio permitir a medição automática, mais rápida e precisa dos volumes celulares e das contagens diferenciais dos leucócitos, o que faz com que o esfregaço de sangue periférico manual não seja realizado para a maioria das amostras [102].

**Amostra:** Sangue total.

**Método:** Coloração de Wright-Giemsa.

**Equipamento:** SP-10, da Sysmex.

Na área responsável pela hematologia, após a realização do hemograma algumas amostras podem ser direcionadas para o sistema de realização e análise automática de esfregaços de sangue. Amostras que apresentam contagens de células do sangue e índices eritrocitários anormais, em que se verifique a presença de blastos, linfócitos anormais ou atípicos, eritroblastos, granulócitos imaturos, entre outras anomalias quantitativas e qualitativas podem ser encaminhadas para o sistema.

O sistema realiza a preparação automática do esfregaço de sangue periférico a partir do tubo de hemograma, seguido da coloração do mesmo e análise ao microscópio. O equipamento inclui um microscópio automático com uma câmara digital de alta qualidade que localiza e tira uma foto de cada célula encontrada que é depois processada e classificada. O sistema consegue diferenciar os diversos tipos de leucócitos, artefactos, plaquetas gigantes, aglomerados de plaquetas e eritrócitos nucleados. Para além disso, consegue ainda analisar a policromasia, hipocromasia, anisocitose, macrocitose, microcitose e poiquilocitose dos eritrócitos [103].

Após análise automática, o sistema pode marcar algumas das amostras para que as imagens sejam revistas por um especialista. Estes vão primeiro rever as imagens que foram tiradas pelo

microscópio e confirmar se todas as células foram corretamente identificadas e, caso seja necessário procederão à visualização do esfregaço num microscópio ótico.

### 3.2.3 Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação dos eritrócitos é um marcador não específico de reações de fase aguda, na inflamação crónica e em malignidades [95]. Durante a inflamação, a concentração das proteínas plasmáticas de fase aguda positiva, principalmente o fibrinogénio e as alfa globulinas, aumenta o que afeta a velocidade de sedimentação normal dos eritrócitos. Para além disso, a velocidade de sedimentação também é afetada pela concentração de albumina plasmática e imunoglobulinas e pelo número, tamanho e morfologia dos eritrócitos [104].

**Amostra:** Sangue total.

**Método:** Método de Westergren.

**Equipamento:** Starsed Interrliner XN, da Sysmex.

Neste método determina-se a viscosidade do plasma através da medição da distância, em milímetros, resultante da queda espontânea dos eritrócitos em suspensão no sangue total anti coagulado num tubo vertical padronizado e no período de uma hora [105].

### 3.2.4 Hemoglobina Glicada

A hemoglobina é uma hemoproteína tetramérica presente nos eritrócitos cuja função primária é o transporte de oxigénio desde os pulmões até aos diferentes tecidos.

A hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) resulta da ligação da glucose à região N-terminal das cadeias  $\beta$  da hemoglobina [106]. Assim, a percentagem de hemoglobina glicada reflete a taxa média de glucose presente no plasma nos 3-4 meses anteriores, considerando-se um excelente marcador para a monitorização da diabetes e até do desenvolvimento de complicações devidas à doença [106,107].

**Amostra:** Sangue total.

**Método:** Ensaio imunoturbidimétrico.

**Equipamento:** Cobas<sup>®</sup> c 513.

Neste método, após lise dos eritrócitos procede-se à medição espectralométrica da hemoglobina total presente na amostra. Ao mesmo tempo, a HbA<sub>1c</sub> reage com um anticorpo anti-HbA<sub>1c</sub> formando um complexo antigénio-anticorpo solúvel. Depois, o polihapteno presente no reagente reage com o excesso de anticorpos anti-HbA<sub>1c</sub> formando complexos insolúveis, os quais são medidos por turbidimetria a 340 nm. A concentração de HbA<sub>1c</sub> na amostra é então inversamente proporcional ao valor da turbidimetria e é expressa como a percentagem relativa à concentração de hemoglobina total presente na amostra [106,108].

### 3.2.5 Imunohematologia

O analisador ORTHO VISION<sup>®</sup> presente no laboratório de hematologia é um sistema automático de imunohematologia que utiliza uma tecnologia de aglutinação em coluna para obtenção dos resultados. O sistema integra a automatização de vários passos como a pipetagem de reagentes e amostras, incubação, centrifugação, interpretação de resultados, entre outros.

O analisador é responsável pela determinação do fenótipo ABO e RH, realização do teste de antiglobulina direto (Coombs direto), pesquisa de anticorpos irregulares (Coombs indireto) e determinação de um painel de 11 células e determinação do D fraco.

#### 3.2.5.1 Determinação do Fenótipo ABO

O sistema ABO é o fenótipo de grupo sanguíneo mais importante, uma vez que os anticorpos do sistema ABO são universais e tem um papel importante na hemólise intravascular devido ao facto de fixarem o complemento [65].

O tipo de grupo sanguíneo do sistema ABO é definido pela presença de antigénios A e/ou B na superfície dos eritrócitos e pela presença de anticorpos anti-A e anti-B no soro [109]. Os antigénios A e B também podem ser encontrados nas membranas das células epiteliais e endoteliais [65]. Assim, os eritrócitos do grupo sanguíneo A apresentam antigénios A e o soro contém anticorpos anti-B. O contrário acontece no grupo B, em que os eritrócitos apresentam antigénios B e o soro contém anticorpos anti-A. No tipo AB os eritrócitos apresentam ambos os antigénios A e B e o soro não apresenta anticorpos. Finalmente, no tipo O os eritrócitos não apresentam antigénios e o soro apresenta ambos os anticorpos anti-A e anti-B [109].

O sistema ABO é o fator mais importante e determinante não só na compatibilidade sanguínea, mas também no transplante de órgãos e a sua determinação evita reações hemolíticas aquando de uma transfusão sanguínea ou um transplante [65].

**Amostra:** Sangue total.

**Método:** Hemaglutinação.

**Equipamento:** ORTHO VISION<sup>®</sup>, da Ortho Clinical Diagnostics.

A determinação do fenótipo ABO baseia-se no princípio da aglutinação dos eritrócitos na presença dos seus anticorpos correspondentes. Este equipamento utiliza a tecnologia de aglutinação em coluna com esferas de vidro na qual está presente o anticorpo contra o antigénio que se pretende detetar. Após adição da amostra e centrifugação, os eritrócitos aglutinados não passam através da coluna de esferas de vidro pelo que ficam no topo da mesma (resultado positivo). Por outro lado, os eritrócitos não aglutinados passam para a base da coluna após a centrifugação (resultado negativo).

### 3.2.5.2 Determinação do Fenótipo RH

O sistema RH é o grupo sanguíneo mais polimórfico, sendo constituído por um conjunto de 50 antígenos. Para além disso, é considerado o grupo sanguíneo mais relevante clinicamente, depois do sistema ABO [110]. No entanto, ao contrário do sistema ABO, os anticorpos contra os antígenos do sistema RH não ocorrem naturalmente e desenvolvem-se apenas após sensibilização, como por exemplo, após gravidez, transfusão, transplante de células estaminais, entre outros.

Os antígenos RH mais relevantes são o D e o CcEe. A formação de anticorpos contra estes antígenos após a sensibilização do indivíduo pode levar, num segundo contacto, à destruição dos eritrócitos no sangue e ser responsável por patologias como a doença hemolítica do recém-nascido ou reações pós-transfusionais [110].

**Amostra:** Sangue total.

**Método:** Hemaglutinação.

**Equipamento:** ORTHO VISION<sup>®</sup>, da Ortho Clinical Diagnostics.

A determinação do fenótipo RH baseia-se no princípio da aglutinação dos eritrócitos na presença dos seus anticorpos correspondentes. Este equipamento utiliza a tecnologia de aglutinação em coluna com esferas de vidro na qual está presente o anticorpo contra o antígeno que se pretende detetar. Após adição da amostra e centrifugação, os eritrócitos aglutinados não passam através da coluna de esferas de vidro pelo que ficam no topo da mesma (resultado positivo). Por outro lado, os eritrócitos não aglutinados passam para a base da coluna após a centrifugação (resultado negativo).

### 3.2.5.3 Pesquisa de Anticorpos Irregulares

Este teste assiste a deteção de anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos e que podem ser clinicamente importantes para garantir o sucesso da transfusão ou da gravidez.

**Amostra:** Soro.

**Método:** Hemaglutinação.

**Equipamento:** ORTHO VISION<sup>®</sup>, da Ortho Clinical Diagnostics.

A determinação de anticorpos irregulares no soro baseia-se na aglutinação de eritrócitos na presença de anticorpos correspondentes. Este teste é realizado numa coluna com esferas de vidro à qual é adicionado o soro a testar e uma suspensão de células de um dador com determinado fenótipo (R1WR1, R2R2 ou rr).

O soro é testado contra células com três fenótipos distintos, e a aglutinação dos eritrócitos numa das colunas determina um resultado positivo significando a presença de anticorpos contra o antígeno correspondente que se encontra nas células do dador. Perante um resultado positivo, procede-se à determinação da especificidade do anticorpo através da utilização de um painel de 11 células.

## 4. Química Analítica

---

É no departamento da química analítica que se realiza o estudo de metabolitos, hormonas, vitaminas, elementos traço, neurotransmissores, metais pesados entre outros bio constituintes com recurso a sistemas analíticos próprios. É também na química analítica que se efetua a confirmação da presença de drogas ilícitas em diversos produtos biológicos, bem como a monitorização de fármacos e a identificação dos respetivos metabolitos. Para além disso, também se procede à análise físico-química e espectroscópica dos cálculos urinários, vesiculo-biliares e prostáticos.

**Período de estágio:** 11/09/2022 – 15/09/2022

**Atividades realizadas/acompanhadas:** Processamento de amostras de utentes bem como amostras da AEQ, execução e avaliação do CQI, validação técnica de resultados, gestão de *stocks*.

### 4.1 Prova da Lactose – Teste Respiratório de Intolerância à Lactose

A lactose é um dissacárido constituído por uma molécula de glucose e uma de galactose ligadas por uma ligação  $\beta$ -glicosídica. A absorção da lactose no intestino delgado requiere a ação da lactase, enzima responsável pela hidrólise do dissacárido [111].

A dor abdominal, o inchaço e a diarreia são alguns dos sintomas característicos da intolerância à lactose que podem ser atribuídos à má absorção da lactose [112]. Esta condição deve-se a uma redução ou ausência da atividade/síntese da lactase, uma alteração que determina uma redução na absorção de lactose pelo intestino com conseqüente aumento da sua fermentação pela flora bacteriana gastrointestinal e produção de ácidos gordos de cadeia curta e gases (maioritariamente, hidrogénio, dióxido de carbono e metano) [113].

Os gases produzidos (como o hidrogénio e o metano), para além de se acumularem no intestino, também atravessam a parede intestinal para a corrente sanguínea e são transportados até aos pulmões onde são excretados na expiração. Nos humanos, a produção de hidrogénio e metano só acontece a partir do metabolismo bacteriano dos hidratos de carbono [112].

**Amostra:** Ar expirado.

**Método:** Eletroquímico/Infravermelho.

**Equipamento:** GastroCH<sub>4</sub>ECK<sup>®</sup> Gastrolyzer<sup>®</sup>, da Bedfont Scientific.

O teste respiratório baseia-se na medição dos gases produzidos no intestino que são depois expirados pelos pulmões após a ingestão de lactose. Realiza-se a medição da respiração basal (sem ingestão de lactose) e, de seguida, procede-se à medição de amostras colhidas aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a ingestão de lactose.

Este é um método seguro, barato e não invasivo que apresenta elevada sensibilidade e especificidade. No entanto, a percentagem de falsos negativos quando se determina apenas a concentração de hidrogénio é elevada, por exemplo devido a indivíduos não produtores de

hidrogénio ou a uma produção aumentada de metano. Assim, procede-se à determinação simultânea de hidrogénio e metano como forma de aumentar a precisão do teste.

## 4.2 Cálculos Renais

A nefrolitíase é uma patologia caracterizada pela presença de cálculos renais ou pedras nos rins, como são mais comumente denominadas. Os cálculos renais podem ocorrer ao nível da zona pélvica renal, da uretra ou da bexiga [65]. A formação de cálculos renais desenvolve-se quando existe sobressaturação da urina com sais. Uma baixa concentração de água na urina ou a presença de promotores físicos, químicos são fatores que podem potenciar a precipitação dos sais com consequente formação de cálculos [65].

A análise dos cálculos renais não é um substituto das análises metabólicas do sangue e da urina, no entanto, pode fornecer informação complementar do ambiente renal aquando da deposição dos cristais e permitir a identificação de fatores de risco ou patologias que possam ter conduzido à formação do cálculo [114].

**Amostra:** Cálculo.

**Método:** Espectrofotometria de infravermelho.

**Equipamento:** IRAffinity-1S, da Shimadzu.

A análise dos cálculos renais é constituída por uma análise macroscópica e microscópica.

Na análise macroscópica determina-se o número de cálculos renais, o seu peso e dimensão, a sua cor e forma. Para além disso procede-se ainda à verificação da presença de depósitos superficiais e da análise das estruturas internas.

A análise microscópica é realizada por espectroscopia de infravermelho de uma pastilha constituída por cálculo que foi esmagado e brometo de potássio. Neste método a amostra é exposta à radiação infravermelha causando alongamento vibracional molecular e flexão de grupos de átomos covalentemente ligados como resposta à excitação. Esta técnica permite também a identificação de materiais não cristalinos como substâncias amorfas de gordura [114]. A determinação definitiva do composto é determinada com recurso a uma biblioteca de espectros de infravermelho.

## 4.3 Porfirinas no Plasma e na Urina

As porfirias são um grupo de doenças metabólicas de natureza genética que se caracterizam por uma disfunção catalítica de enzimas específicas da via da biossíntese do heme, levando à acumulação de intermediários da via. A sintomatologia é maioritariamente ao nível neurológicos e/ou foto cutâneo, dependendo do intermediário metabólico que se acumula. Em cada porfiria, os padrões distintos desses metabolitos no plasma, urina e fezes são a base para a determinação do defeito metabólico responsável pelos sintomas observados [115].

O diagnóstico clínico das porfirinas é difícil uma vez que estas são um grupo de doenças com um espectro de sintomas largo e pouco específico. No entanto, quando existe suspeita de doença, o seu diagnóstico pode ser estabelecido por testes de laboratório facilmente acessíveis como por exemplo a determinação das porfirinas e seus precursores no plasma, sangue, urina e fezes [116].

**Amostra:** Urina de 24h ou plasma

**Método:** Cromatografia líquida de alta-definição (HPLC).

**Equipamento:** Analisador automático de HPLC.

A determinação de porfirinas no plasma e na urina realiza-se por HPLC. O HPLC é uma técnica cromatográfica que permite separar, identificar e quantificar metabolitos de uma mistura como uma amostra biológica [117,118].

O sistema de HPLC para determinação das porfirinas é constituído por uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase móvel tem polaridade variável, sendo normalmente uma mistura de dois solventes de polaridade diferente que são utilizados em gradiente, fazendo com que a polaridade geral da fase móvel possa aumentar ou diminuir ao longo do tempo. A fase estacionária é normalmente constituída por partículas de sílica às quais estão ligados radicais que interagem com os componentes da amostra em diferentes graus afetando a sua separação [118]. Assim, os componentes da amostra interagem mais ou menos com a fase estacionária o que significa que para serem eluídos da coluna uns necessitam de uma maior polaridade que outros. O tempo que os metabolitos demoram a ser removidos da coluna é diferente para cada um, dentro das mesmas condições, e pode ser utilizado para identificar os diferentes compostos presentes na amostra [118].

## 4.4 Cobre na Urina

O cobre é um elemento vestigial essencial na constituição de diversas enzimas celulares importantes e como componente estrutural de algumas proteínas, no entanto, um excesso de cobre pode ser prejudicial para as células. Apenas pequenas quantidades de cobre estão presentes nos fluidos biológicos e na maioria das vezes nunca na sua forma livre [65,119].

A determinação do cobre urinário é um parâmetro importante no diagnóstico e tratamento da doença de Wilson, doença genética que resulta em acumulação de cobre no fígado ou no sistema nervoso [119,120]. Para além disso, também é possível verificar níveis elevados de cobre urinário em casos de doença hepática, síndrome nefrótica e intoxicação por cobre [120].

**Amostra:** Urina aleatória ou de 24h.

**Método:** Espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite.

**Equipamento:** AA-7000, da Shimadzu.

O método utilizado para determinação do cobre na urina é a espectrofotometria de absorção atômica. Esta é uma técnica espectrofotométrica de absorção na qual o átomo metálico, neste caso o cobre, presente na amostra absorve radiação a um comprimento de onda específico [65].

A análise da amostra tem início com a introdução automática da amostra no forno de grafite. A temperatura do forno aumenta iniciando-se o ciclo de secagem, importante para a remoção de solventes. Com a finalidade de decompor ou até remover alguns dos componentes da matriz utiliza-se um (ou mais) ciclos de pré-tratamento térmico. Durante estes ciclos (secagem e pré-tratamento térmico) os vapores resultantes da volatilização do solvente e da matriz vão sendo removidos do forno de grafite por um sistema de gás inerte interno que passa através do mesmo. Por fim, existe um aquecimento muito rápido e alto do forno de grafite e inicia-se o ciclo de atomização, onde se promove a vaporização e a atomização do analito de interesse. Durante este ciclo, o sistema de gás inerte é interrompido para assegurar que os átomos se mantêm no forno de grafite o maior tempo possível, uma vez que é durante esse período de tempo que a absorvância do analito é medida. As lâmpadas utilizadas emitem um espectro e o monocromador seleciona o comprimento de onda que vai passar através do forno de grafite. A concentração do analito é depois calculada com base numa curva de calibração [121].

## 5. Conclusão

---

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa proporciona as bases necessárias para que os alunos apresentem as capacidades práticas e conhecimentos teóricos necessários para trabalhar num laboratório de Análises Clínicas. A oportunidade que o Curso me ofereceu de realizar um Estágio Profissional num laboratório foi considerada uma mais-valia, onde tive a oportunidade de aprofundar e consolidar aquilo que aprendi.

A realização do estágio no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves Saúde foi uma experiência que considero enriquecedora, não só em termos profissionais, mas também em termos pessoais. De um modo geral, durante o período de estágio tive a possibilidade de realizar diversas tarefas do dia a dia do laboratório autonomamente, mas também em equipa. Para além disso pude desenvolver e partilhar conhecimentos teórico-práticos. O facto de o estágio se realizar em contexto real de trabalho e visto se tratar de um laboratório amplamente automatizado permitiu-me adquirir conhecimentos extraordinários e consolidar outros adquiridos no Curso. Assim, considero que se pode determinar que os objetivos de estágio propostos foram, não só alcançados, mas até superados.

# **Capítulo 2**

## **Monografía**

# 1. Antibióticos

---

Está descrito que o nome “antibiótico” foi definido pela primeira vez em 1947 por Selman Abraham Waksman como uma substância química, produzida por microrganismos, que apresenta capacidade de inibir o crescimento (atividade bacteriostática) ou até mesmo matar (atividade bactericida) bactérias e outros microrganismos [122].

Atualmente, o termo antibiótico ganhou um significado mais abrangente, passando a incluir substâncias químicas tanto de origem natural como semissintética ou sintética que apresentem atividade bacteriostática ou bactericida contra bactérias e que são inúteis contra infecções virais [123,124].

## 1.1 Perspetiva Histórica

A descoberta dos antibióticos e a sua produção em larga escala no início do século vinte é considerada por muitos como uma das maiores conquistas da história da medicina [125].

A introdução destes medicamentos inovadores aumentou a qualidade e a esperança média de vida de uma forma considerável, pois não só contribuiu para o tratamento de doenças infecciosas como também tornou possível a concretização de vários procedimentos médicos modernos como, por exemplo, tratamento de cancro, transplantes e outro tipo de cirurgias, uma vez que ajudou a diminuir as taxas de infeção nestas situações [125,126].

No entanto, isto é exemplo do que acontece nos países industrializados onde as doenças infecciosas se tornam um problema para pessoas com doenças imunes ou aquelas infetadas com microrganismos multirresistentes. Na maioria dos países de terceiro mundo a situação ainda é semelhante aquela que o mundo experienciou a partir de 1900, numa altura em que este tipo de doenças era responsável por uma enorme percentagem da mortalidade [125].

### 1.1.1 Era Pré Antibióticos

O uso de microrganismos com propriedades antibióticas para a prevenção e cura de doenças data há mais de 2000 anos, havendo registo de remédios caseiros à base de pão bolorento usados para tratar feridas. Na verdade, o documento médico mais antigo, designado papiro de Ebers e datado de 1550 a.c., já mencionava os remédios caseiros à base de pão bolorento bem como solo medicinal na sua lista de remédios. Há também registo de uma receita anglo-saxónica com 1000 anos capaz de matar *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina [126].

Claramente, estes remédios caseiros eram usados com pouco ou nenhum conhecimento dos agentes causais destas infeções. Foi apenas em 1863, quando Antonie van Leeuwenhoek observou, descreveu e desenhou bactérias pela primeira vez, que a história do desenvolvimento dos antibióticos teve realmente início. A partir dessa descoberta, cada vez mais cientistas começaram a tomar interesse nos fungos e na sua potencial atividade antibacteriana. Foram realizadas várias experiências ao longo do século dezanove, nomeadamente com *Penicillium*, no entanto ou as conclusões retiradas nunca eram as mais corretas, como aconteceu com Theodor Billroth, ou então, apesar de se verificar que o *Penicillium* era capaz de inibir o

crescimento bacteriano, a importância das bactérias como patógenos humanos ainda não estava provada, como aconteceu com John Tyndall [124].

Foi apenas na segunda metade do século dezanove que se começou a questionar qual seria a natureza das doenças infecciosas. Apesar de já se acreditar que os patógenos poderiam ser transmitidos entre seres vivos, Robert Koch foi o primeiro a conseguir provar esta teoria ao identificar o agente causal do antrax, da cólera e da tuberculose [124].

### 1.1.2 Era dos Antibióticos

O primeiro antibiótico natural a ser descoberto foi o ácido micofenólico e foi reportado em 1893 por um microbiologista e médico italiano, Bartolomeo Gosio. Enquanto estudava a etiologia dos casos de pelagra em comunidades do sul europeu e dos Estados Unidos, Gosio isolou e cultivou *Penicillium brevi-compactum* (atualmente *Penicillium glaucum*) do milho e, a partir deste, obteve um produto cristalino [124]. Após essa descoberta, foi verificado que o ácido micofenólico inibia o crescimento de *Bacillus anthracis* e, mais tarde, que este possui também propriedades antivirais, antifúngicas, anti tumorais e antipsóricas [127]. Esta descoberta passou despercebida até 1913, ano em que o ácido micofenólico foi redescoberto nos Estados Unidos [128]. No entanto, foi apenas em 1995 que este foi aprovado pela US Food and Drug Administration mas como um imunossupressor e não antibiótico [128].

A primeira década do século vinte foi marcada pelo aparecimento do primeiro agente antibacteriano sintético, a arsfenamida, também conhecida como Salvarasan. Este foi sintetizado por Paul Ehrlich em colaboração com Alfred Bertheim e Sahachiro Hata e aprovado em 1910. Esta descoberta foi fruto de um projeto que começou em 1906, ano em que Ehrlich e o seu grupo começaram a sintetizar e a testar compostos derivados do ácido arsênico em estirpes bacterianas. Depois de muitas experiências, finalmente o grupo descobriu um composto eficaz contra estirpes de espiroquetas e tripanossoma. Estas descobertas levaram a que o composto chegasse a ensaios clínicos e ao seu anúncio como eficaz no tratamento da sífilis, doença causada pelo *Treponema pallidum*. Durante quase 40 anos, Salvarasan foi a terapia de eleição para o tratamento da sífilis, tendo sido introduzidas versões melhoradas ao longo dos anos que causavam menos efeitos secundários [124,125].

Em 1928, depois de voltar de férias, Alexander Fleming, observou que à volta de uma grande colónia de um fungo contaminante, as colónias de *Staphylococcus* tinham-se tornado transparentes e sofreram lise [125]. Este acontecimento tornou-se a primeira demonstração de um halo de inibição [129]. Apesar desta descoberta já ter acontecido a outros cientistas, Fleming foi o primeiro que decidiu investigar mais a fundo. Assim, Fleming procedeu ao isolamento do fungo e aplicou filtrados de cultura do fungo em estirpes de bactérias patogénicas observando efeitos semelhantes aos de *Staphylococcus*, principalmente noutras bactérias Gram-positivas. Isto levou-o a concluir que o fungo era o responsável por libertar uma substância com capacidade de matar bactérias [124]. O fungo foi identificado como *Penicillium notatum* e ao filtrado foi dado o nome de penicilina [129]. No entanto, Fleming não foi capaz de produzir quantidades suficientes de penicilina nem foi capaz de determinar a sua estrutura, pelo que a produção em larga escala e a elucidação da estrutura da penicilina só viriam a tornar-se possíveis cerca de 10 anos depois [125].

Howard Walter Florey e Ernst Boris Chain foram os responsáveis pela determinação da estrutura da penicilina em 1939, tendo Chain, mais tarde, conseguido também isolar uma pequena quantidade da substância. Subsequentemente, Norman Heatley melhorou o processo de extração da penicilina, possibilitando a obtenção de quantidades suficientes para efetuar os primeiros ensaios [125,130]. Assim, em 1940, já havia quantidade suficiente de penicilina para que Heatley e os seus colegas realizassem um ensaio em ratos, onde puderam demonstrar os efeitos da penicilina *in vivo* [130].

O próximo passo na história da penicilina seria a realização de ensaios em humanos. A primeira doente recebeu penicilina em 1941, mas sofreu efeitos secundários devido a impurezas que ainda estavam na mistura de penicilina. Devido a este incidente, um bioquímico do laboratório de Fleming, Edward Abraham, em conjunto com Chain, sugeriu que a penicilina poderia ser ainda mais purificada. Entre 1941 e 1942, Florey, Heatley e Chain conduziram uma série de ensaios em 170 doentes, que comprovaram os efeitos extraordinários da penicilina no combate de infecções bacterianas sem apresentar efeitos secundários tóxicos [130].

Depois do reconhecimento do potencial da penicilina para tratamento de soldados e civis durante a segunda guerra mundial, Florey e Heatley em conjunto com colegas americanos, criaram um projeto que tinha como objetivo melhorar a purificação da penicilina e encontrar uma empresa farmacêutica capaz de realizar a produção em massa do composto. Após a guerra, por volta de 1946, a penicilina passou a estar disponível para prescrição [130], sendo o primeiro antibiótico com capacidade de matar bactérias Gram-positivas, incluindo agentes patogênicos da gonorreia, sífilis e infecções puerperais.

A descoberta da penicilina em 1928 mudou o rumo da história da medicina e dos antibióticos, dando início à era da descoberta dos antibióticos que aconteceu entre 1940-1960 e cujo pico foi por volta de 1950. Foi durante este período que a maioria das classes de antibióticos que se usam atualmente foram identificadas, começando-se também erradamente a acreditar que ao ritmo a que estes eram descobertos, as doenças infecciosas iriam tornar-se um problema de saúde pública controlado [125].

A descoberta de atividade antibiótica da classe sintética das sulfonamidas por Paul Domagk em 1930 foi também um grande marco na história dos antibióticos. Tudo começou com uma testagem em larga escala (inspirada pelas descobertas de Ehrlich) de corantes antibacterianos *in vitro* e *in vivo* no instituto de Domagk. Em 1932, um corante de cor vermelha mostrou-se efetivo contra uma dose letal de *Streptococcus*, sendo proclamado por Domagk uma taxa de sucesso de 100%. Esta substância, a sulfamidocrisoidina, era bastante eficaz *in vivo* e quase ineficaz *in vitro*. Isto pôde ser explicado mais tarde por Tréfouël, que descobriu que a sulfamidocrisoidina é um precursor da sulfanilamida, a substância ativa que é obtida quando a primeira é degradada por enzimas humanas. Em 1935, logo após a comercialização do prontossil (nome de mercado), observou-se uma diminuição drástica das mortes devidas a pneumonia, febre puerperal e meningite uma vez que esta se trata de uma substância efetiva contra cocos Gram-positivos (principalmente *Streptococcus*) [125].

## 2. Classes de Antibióticos

---

Foi durante a era da descoberta dos antibióticos, entre 1940 e 1962, que se iniciou a comercialização de mais de vinte novas classes de antibióticos. Desde então, apenas duas novas classes foram introduzidas no mercado [131].

### 2.1 $\beta$ -Lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos estão entre as classes de antibióticos mais utilizadas e englobam uma variedade de subclasses como as penicilinas, as cefalosporinas e os carbapenemos [132]. Foi desde a descoberta da penicilina que novos derivados e novas classes de  $\beta$ -lactâmicos foram desenvolvidos, sempre com o objetivo de aumentar o seu espectro de atividade ou então para contornar mecanismos de resistência que tenham surgido com a sua utilização [133].

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são agentes bactericidas que atuam ao nível da formação da parede celular da bactéria. Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresentam o mesmo mecanismo de ação: ligam-se covalentemente ao sítio ativo das proteínas de ligação à penicilina (PBPs), enzimas necessárias ao último passo da formação das ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas do peptidoglicano tanto em bactérias Gram-negativas como em Gram-positivas. Esta ligação impede a síntese do peptidoglicano, o que, conseqüentemente, origina auto lise e morte celular [133].

O mecanismo de ação das penicilinas foi descrito pela primeira vez por Tipper e Strominger em 1965, tendo estes mencionado a semelhança estrutural entre a penicilina e a região terminal do dipéptido da cadeia de peptidoglicano em formação numa célula bacteriana em fase de divisão [133].

### 2.2 Quinolonas e Fluoroquinolonas

A classe das quinolonas é constituída por uma série de compostos de origem sintética que, em comum, apresentam um anel bicíclico associado à 4-quinolona. Foi desde a descoberta acidental em 1962 da primeira quinolona – o ácido nalidíxico. – que a importância clínica desta classe de antibióticos tem vindo a aumentar. É considerada uma terapia chave no tratamento de infeções comunitárias e hospitalares, por se pensar que apresenta uma elevada eficácia, um largo espectro de atividade, biodisponibilidade, elevadas concentrações séricas e baixa incidência de efeitos secundários [134].

Esta descoberta levou ao desenvolvimento de uma biblioteca de compostos que permitiram um melhor entendimento do mecanismo de ação das quinolonas, perceber que existia a possibilidade de modificar estruturalmente estes compostos de maneira a melhorar a sua ação e a alargar o espectro de atividade, melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das quinolonas e entender a importância entre a estrutura e a atividade das quinolonas em relação à susceptibilidade aos mecanismos de resistência das diferentes bactérias e o seu potencial para causar efeitos adversos [135].

Como resultado dessa pesquisa resultou o desenvolvimento das fluoroquinolonas, consequência da adição de um átomo de flúor ao carbono seis do anel bicíclico [135]. Estas apresentam um espectro de atividade mais alargado e um melhoramento da farmacocinética quando comparado com a primeira geração de quinolonas. Apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas incluindo o agente causal da tuberculose [134].

As quinolonas atuam interferindo com a síntese e a replicação do DNA das bactérias e têm como alvo as enzimas topoisomerase II (DNA girase) e a topoisomerase IV. Durante a replicação, estas enzimas criam ruturas na cadeia dupla do cromossoma bacteriano com o objetivo de relaxar as torções positivas do DNA. Tirando partido da atividade das topoisomerases, as quinolonas ligam-se não covalentemente ao complexo DNA-enzima inibindo o processo de replicação e levando à morte celular.

A existência de um equilíbrio entre a rutura e a religação do DNA é crítico para a sobrevivência da célula, a ligação das quinolonas às topoisomerases pode perturbar esse equilíbrio por diferentes mecanismos como: (1) Se os níveis de rutura do DNA mediados pela DNA girase diminuem então a taxa de replicação diminui, causando implicações ao nível do crescimento celular. (2) Se os níveis de rutura do DNA mediados pela topoisomerase IV diminuem, as células não conseguem desenrolar os cromossomas filhos e morrem por falha mitótica. (3) Se os níveis de rutura mediada pela DNA girase ou pela topoisomerase IV se tornarem muito altos, os sistemas de verificação do DNA podem converter esses complexos em ruturas permanentes de cadeia dupla. Estas ruturas iniciam a resposta de emergência e outras vias da reparação do DNA, o que pode levar à morte celular [134,136].

## 2.3 Aminoglicosídeos

O primeiro aminoglicosídeo, a estreptomicina, foi introduzido em 1944 e foi isolado a partir de uma estirpe de *Streptomyces anulatus*, durante um estudo de substâncias antibacterianas que pretendia reproduzir a descoberta da penicilina. Desde essa descoberta houve a introdução de novos aminoglicosídeos como a gentamicina, a canamicina e a tobramicina, tendo estes estabelecido o uso desta classe no tratamento de infeções por bacilos Gram-negativos [125,137].

A estrutura dos aminoglicosídeos consiste num anel aminociclitol unido a dois ou mais açúcares aminados através de ligações glicosídicas. Os diferentes aminoglicosídeos são distinguidos pelos diferentes açúcares aminados que os constituem [137,138].

Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas que inibem o processo da síntese proteica e alteram a integridade da membrana celular bacteriana. Estes ligam-se à subunidade 30S dos ribossomas associados à membrana celular o que leva à inibição da síntese proteica com consequente disrupção da estrutura da membrana plasmática e morte celular [137].

## 2.4 Glicopéptidos

Os antibióticos da classe dos glicopéptidos são produzidos por um grupo de actinomicetes que habitam o solo. O primeiro glicopéptido descrito foi a vancomicina, produzida por *Amiclatopsis orientalis*, e tornou-se disponível para uso clínico como um antibiótico anti estafilococos, especialmente para tratamento de *Staphylococcus* meticilina resistentes (MRSA) [125].

Os glicopéptidos são moléculas complexas e únicas que podem ser sintetizadas por uma variedade de espécies. A sua estrutura apresenta um domínio heptapéptido relativamente conservado e no qual cinco dos resíduos de aminoácidos são comuns a todos os compostos. Os glicopéptidos vão poder ser distinguidos pelos aminoácidos presentes nas posições 1 e 3 [139].

Os glicopéptidos atuam por ligação à extremidade D-alanil-D-alanina do pentapéptido terminal do lípido II do peptidoglicano, prevenindo assim a transpeptidação e transglicosilação do peptidoglicano por sequestração do substrato e por impedimento estérico, respetivamente. Este mecanismo, exclusivo em bactérias Gram-positivas, impede a elongação das cadeias de peptidoglicano e conseqüentemente a síntese de peptidoglicano [125,139,140].

## 2.5 Macrólidos

O primeiro macrólido isolado e descrito, a eritromicina, foi obtido a partir de uma estirpe de *Streptomyces erythreus* isolada de uma amostra de solo em 1952 [125].

Estruturalmente, todos os macrólidos são moléculas hidrofóbicas que apresentam um anel macrocíclico de lactona constituído por 12 a 16 cadeias, característica que confere o nome à classe [125,141].

Os macrólidos atuam inibindo a síntese proteica ao se ligarem à subunidade 50S do ribossoma e ocupando o local de saída do péptido nascente [142]. No entanto, parece que esta premissa não é assim tão certa e a interferência dos macrólidos na síntese proteica depende do péptido em formação [143].

## 2.6 Tetraciclinas

Os primeiros compostos da classe das tetraciclinas a serem descobertos foram a clortetraciclina e a oxitetraciclina, no final dos anos 40. Ambas as moléculas são bio produtos sintetizados a partir de microrganismos, *Streptomyces aureofaciens* e *Streptomyces rimosus*, respetivamente [144]. Ao longo dos anos, foi-se identificando outras moléculas pertencentes a esta classe de antibióticos, algumas com origem natural, outras semissintéticas e outras totalmente sintéticas [145].

O seu espectro de atividade alargado e a ausência de efeitos secundários graves, resultou no uso exagerado desta classe de antibióticos no tratamento de infeções em humanos e animais nos anos após a sua descoberta. Como tal, rapidamente se detetou a emergência de microrganismos resistentes a esta classe de antibióticos e conseqüentemente o declínio do seu uso [125,145].

As tetraciclina são constituídas por uma estrutura comum tetracíclica fundida linearmente à qual se podem ligar uma variedade de grupos funcionais [144], e atuam inibindo a síntese proteica da bactéria ao se ligarem ao 16S rRNA da subunidade 30S do ribossoma [145]. Esta ligação previne a associação do aminoacil-tRNA com o ribossoma e conseqüentemente impede a formação do péptido nascente [144].

## 2.7 Oxazolidinonas

Esta classe de antibióticos foi identificada pela primeira vez após a era dos antibióticos, em 1978 e é constituída por compostos sintéticos com atividade contra Gram-positivos [125].

O elemento estrutural mais importante e comum a todas as moléculas desta classe é o anel heterocíclico de cinco membros de oxazolidinona ao qual está ligado um grupo acetamidometil [125].

As oxazolidinonas atuam por ligação à subunidade 50S do ribossoma, com a conseqüente inibição da fase inicial da tradução. Estas ligam-se ao sítio A do ribossoma interferindo na ligação da estrutura aminoacil do aminoacil-tRNA ao ribossoma [146].

## 2.8 Fosfomicina

A fosfomicina é um agente antibiótico que foi descoberto em 1969. É produzido a partir de culturas de estirpes do género *Streptomyces* [147].

É um agente bactericida que inibe a formação do precursor do peptidoglicano UDP ácido N-acetilmurâmico ao se ligar covalentemente ao sítio ativo da enzima envolvida na formação deste precursor [148].

### 3. Resistência Bacteriana aos Antibióticos

---

A resistência aos antibióticos define-se como a capacidade ao escape, por parte das bactérias, aos efeitos dos antibióticos [149].

Foi logo após a descoberta da penicilina que se detetou o primeiro sinal de resistência aos antibióticos, reportado por Abraham e Chain em 1940. Estes afirmaram que uma estirpe de *Escherichia coli* possuía a capacidade de inativar a penicilina através da produção de uma enzima, a penicilinase [130].

A resistência aos antibióticos ocorre de forma natural, no entanto, a introdução de novas classes de antibióticos no mercado e o seu uso prolongado e descuidado tem vindo a acelerar este processo [150].

A emergência de um fenótipo resistente não depende apenas da pressão seletiva criada com a utilização dos antibióticos, mas também de fatores como: o grau da expressão da resistência, capacidade da bactéria para tolerar o mecanismo de resistência, local inicial de colonização, entre outros [151].

A resistência aos antibióticos é atualmente considerada como uma das maiores ameaças à saúde global, segurança alimentar e desenvolvimento. É uma grande preocupação de organizações de saúde como a Organização Mundial de Saúde uma vez que a disseminação de resistência tem grandes consequências como a diminuição da eficácia da terapia, aumento das complicações clínicas e até aumento da taxa de morbilidade [150,152].

#### 3.1 Genética

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica natural do microrganismo e é comum a todos os membros daquele género. Um exemplo é a resistência de *Escherichia coli* à vancomicina.

A resistência adquirida ocorre quando uma bactéria anteriormente sensível ao antibiótico desenvolve resistência para esse antibiótico [153]. Neste caso, o desenvolvimento de resistência pode ocorrer através de mutações no material genético ou pela aquisição de novo DNA que contem a informação genética que confere a resistência [154].

##### 3.1.1 Mutações

As mutações genéticas são eventos espontâneos que ocorrem independentemente da presença de antibióticos, sendo por essa razão, também denominadas de mutações espontâneas ou dependentes do crescimento celular [151].

Aquando da replicação e síntese do DNA, a célula possui mecanismos que garantem a correção de erros e reparação do material genético caso for necessário. Assim, a frequência a que ocorrem mutações que não sejam deletérias para a célula e que confirmam um mecanismo de resistência é relativamente baixa [154].

No entanto, a ocorrência destas mutações, apesar de rara, não é impossível e, na maioria das vezes, está relacionada com a alteração estrutural da molécula que serve de alvo ao antibiótico

[151]. Existem também mecanismos bioquímicos de resistência que estão associados à ocorrência de mutações como: a variação da expressão dos sistemas que permitem a entrada ou saída do antibiótico na célula, aumento da síntese de enzimas inativadoras do antibiótico, entre outros [155].

As bactérias com este tipo de mutações apresentam uma maior vantagem, quando na presença de antibióticos, comparativamente com células suscetíveis, levando à criação de uma população resistente [153].

### 3.1.2 Hipermutantes

A hipermutabilidade caracteriza-se pelo aumento das taxas de mutação espontâneas de um microrganismo. A bactéria entra neste estado quando exposta a uma pressão seletiva prolongada. Se durante este estado uma célula obtém uma mutação que lhe confere vantagem no meio seletivo, esta cresce e replica-se ao mesmo tempo que termina o estado de hipermutabilidade [155].

Este tipo de fenótipo foi detetado em vários microrganismos, como por exemplo: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* [155].

### 3.1.3 Mutagénese Adaptativa

As mutações do material genético podem também ocorrer em células que não se encontram em divisão. Este tipo de mutações, denominadas mutações adaptativas, diferem das mutações espontâneas por ocorrerem apenas durante a presença de um meio de pressão seletiva que as favorece [155].

Demostrou-se que alguns antibióticos, como as quinolonas, têm a capacidade de induzir a resposta mutagénica e aumentar a taxa de estirpes *Escherichia coli* resistentes [156]. Assim, este processo é considerado como uma das principais causas do desenvolvimento da resistência aos antibióticos [155].

### 3.1.4 Transferência Horizontal de Genes

A transferência horizontal de genes é considerada o principal mecanismo pelo qual há transferência de genes de resistência aos antibióticos [155]. Este processo pode ocorrer através de vários mecanismos sendo os mais importantes: a transformação, a transdução e a conjugação. Durante a transformação, DNA extracelular é incorporado pelas células. Na transdução há a transferência de DNA cromossomal ou extracromossomal entre bactérias através de um bacteriófago, um vírus que utiliza as bactérias como via da sua replicação. A conjugação descreve a transferência de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, entre bactérias [157].

Após cada um destes processos os genes são incorporados no genoma da bactéria por recombinação ou transposição, o que pode causar alterações na sequência genética.

## 3.2 Mecanismos de Resistência

O entendimento dos diversos mecanismos de resistência é de bastante importância no desenvolvimento de novas terapias contra microrganismos resistentes a um ou mais antibióticos.

A maneira como as bactérias adquirem resistência pode variar entre as diferentes espécies, no entanto existem apenas alguns mecanismos que conferem essa resistência [155].

### 3.2.1 Inativação ou Modificação do Antibiótico

#### a) Hidrólise

Muitos dos antibióticos utilizados na terapêutica contra infecções bacterianas apresentam ligações químicas suscetíveis à hidrólise. Algumas bactérias desenvolvem enzimas com capacidade de hidrolisar essas ligações e assim inativarem os antibióticos antes destes chegarem ao seu alvo [158].

Um exemplo muito estudado são as  $\beta$ -lactamases que são capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas e das cefalosporinas [158]. Nos últimos anos tem-se notado um aumento da incidência e da prevalência de  $\beta$ -lactamases de largo espectro, isto é, que apresentam a capacidade de hidrolisar antibióticos de diversas classes. Este tipo de  $\beta$ -lactamases já foi identificado em estirpes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* [159]. Com o objetivo de restaurar o poder antibiótico dos  $\beta$ -lactâmicos, desenvolveram-se moléculas com capacidade de inibir a ação das  $\beta$ -lactamases. Estes são administrados em simultâneo com o antibiótico e ligam-se às  $\beta$ -lactamases atuando como “protetores” do seu ataque contra o antibiótico.

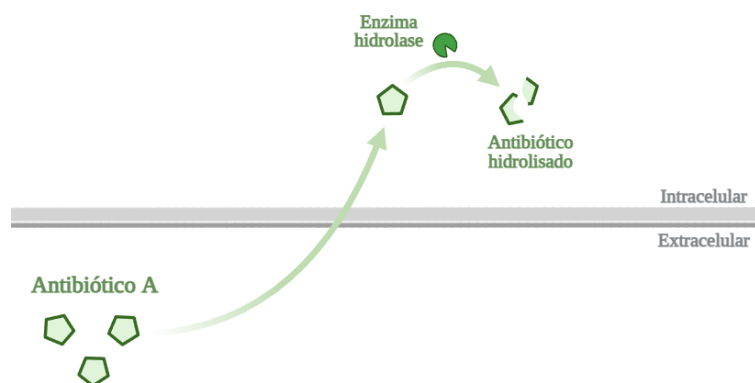


Figura 7. Mecanismo de resistência de modificação do antibiótico por hidrólise

#### b) Adição de Grupos

Existe um grupo de enzimas, as transferases, que apresentam a capacidade de inativar antibióticos pela adição de grupos adenilil, fosforil e acetil. Este processo ocorre durante o transporte do antibiótico pela membrana citoplasmática e afeta antibióticos como: aminoglicosídeos e macrólidos [151].

A inativação enzimática dos aminoglicosídeos por transferência de grupo é a mais prevalente forma de resistência contra esta classe de antibióticos, em situação clínica. Existem três enzimas principais responsáveis pela neutralização desta classe de antibióticos: a fosforiltransferase, a nucleotidiltransferase e acetiltransferase [160]. Para além disso, os genes destas enzimas podem ser transmitidos horizontalmente entre bactérias através de plasmídeos, integroões ou transposões [150].

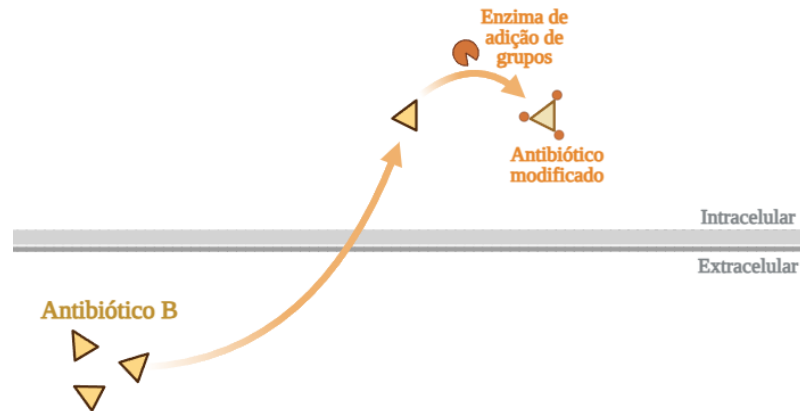


Figura 8. Mecanismo de resistência de modificação do antibiótico por adição de grupos.

### 3.2.2 Modificação do Alvo

A modificação do alvo antibiótico impede a sua correta ligação ao antibiótico. As modificações que ocorrem devem reduzir a suscetibilidade do alvo ao mesmo tempo que mantêm a função celular, para evitar prejudicar a célula. Em alguns casos a modificação do alvo é acompanhada por outras alterações na célula que vão compensar a alteração das características do alvo [155].

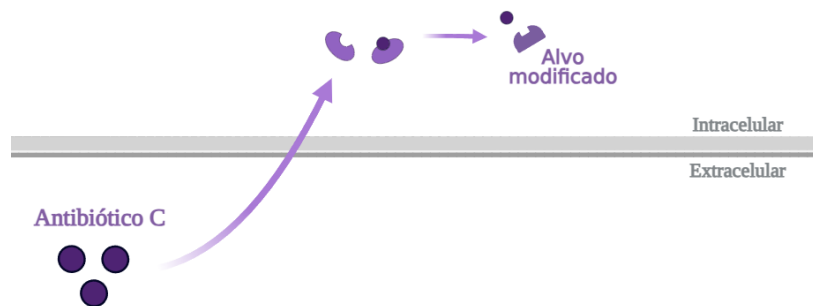


Figura 9. Mecanismo de resistência de modificação do alvo do antibiótico.

#### a) Alteração da Estrutura do Peptidoglicano

As enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano são alvos excelentes para os antibióticos, uma vez que a manutenção da integridade desta estrutura é essencial para o crescimento e sobrevivência da célula [155].

Por exemplo, a presença de mutações nas proteínas de ligação à penicilina tem como consequência a diminuição da afinidade dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos para esse alvo. Esta é a

explicação para a existência de resistência contra a ampicilina por parte de *Enterococcus faecium* e contra a penicilina por parte de *Streptococcus pneumoniae* [155,161].

Outro exemplo, seria a resistência de *Staphylococcus aureus* a alguns  $\beta$ -lactâmicos conferida pela síntese de uma nova proteína de ligação à penicilina, diferente daquela que normalmente é encontrada na bactéria. Esta proteína garante a sobrevivência da célula na presença desta classe de antibióticos ao cumprir a sua função na síntese do peptidoglicano [162].

#### b) Interferência na Síntese Proteica

Uma grande variedade de antibióticos interfere com a síntese proteica, atuando a diversos níveis do metabolismo proteico sendo a fase de alongação um dos principais focos. Um dos alvos preferidos é o ribossoma bacteriano e as suas subunidades [155].

Um dos exemplos mais bem estudado e clinicamente relevante é o da metilação do RNA ribossomal por uma metiltransferase. Duas metiltransferases metilam dois átomos do RNA ribossomal da subunidade 16S levando à modificação do local de ligação do antibiótico ao ribossoma e conferindo resistência a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos [163].

#### c) Interferência na Síntese do DNA

Os principais alvos antibióticos durante a síntese do DNA são as enzimas DNA girase e a topoisomerase IV.

Os antibióticos da classe das quinolonas têm ação ao nível destas enzimas. Assim, algumas bactérias, como a *Escherichia coli*, apresentam mutações nos genes que codificam para a DNA girase e a topoisomerase IV causando modificações dessas enzimas e impedindo assim a ligação do antibiótico [164].

### 3.2.3 Modificações ao Nível da Membrana

#### a) Bombas de Efluxo

As bombas de efluxo afetam antibióticos de todas as classes, especialmente aqueles que necessitam de entrar na célula para atuar num alvo intracelular como os macrólidos, as tetraciclina e as fluoroquinolonas [155].

Este mecanismo de resistência está associado à resistência a múltiplos antibióticos por parte de um único microrganismo, uma vez que um único transportador apresenta a capacidade de expelir vários antibióticos com diferentes modos de ação. Muitos destes transportadores também apresentam uma expressão constitutiva que providencia uma resposta imediata quando detetam moléculas tóxicas para a célula. No entanto, a presença de antibióticos no meio leva à seleção de mutantes que apresentam a capacidade de sobreexpressar os transportadores e consequentemente uma resistência aumentada para os antibióticos [165].

Este é o exemplo em *Pseudomonas aeruginosa*, em que a sua bomba de efluxo apresenta normalmente uma regulação positiva na presença de antibióticos, mas que, devido a mutações no seu regulador, pode apresentar uma sobreexpressão da bomba de efluxo conferindo um aumento da resistência a antibióticos, como  $\beta$ -lactâmicos, por parte desta bactéria [155].

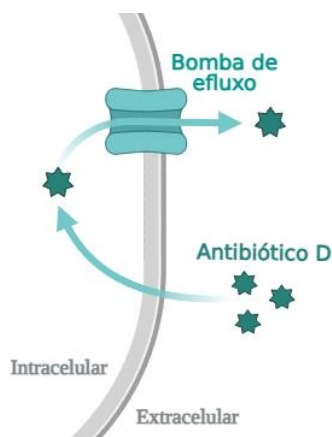


Figura 10. Mecanismo de resistência devido à presença de bombas de efluxo.

### b) Mudança na Permeabilidade da Membrana Externa

As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa composta por uma membrana interna de fosfolípidos e uma membrana externa de LPS. Esta composição diminui a capacidade de penetração dos antibióticos pelo que estes podem ser transportados por: porinas, difusão através da bicamada ou por absorção autopromovida. Esta última ocorre no LPS em locais carregados negativamente (fosfato e/ou grupos carboxilo) que se ligam fortemente a cátions bivalentes como o  $Mg^{2+}$  e o  $Ca^{2+}$ . A associação não-covalente entre o LPS e estes cátions é uma componente essencial da integridade da membrana externa. Há alguns antibióticos que parecem entrar desta forma, nomeadamente antibióticos policatiônicos [155].

As porinas são uma via de entrada para pequenos antibióticos hidrofílicos como os  $\beta$ -lactâmicos, as tetraciclina e as fluoroquinolonas. Assim, verifica-se que qualquer modificação que resulte na perda ou na mudança funcional das porinas e, conseqüentemente, na diminuição da sua capacidade de transportar estas moléculas para o interior da célula, pode originar resistência. Esta situação foi já reportada para uma variedade de microrganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* [166].



Figura 11. Mecanismo de resistência de alteração da permeabilidade da membrana.

## 4. O Exemplo de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes

---

### 4.1 Características Gerais

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) foi descrito pela primeira vez numa série de observações clínicas e experiências laboratoriais publicadas entre 1880 e 1882 por Ogston [167]. Esta identificação teve por base a observação de fluídos purulentos de abscessos e foi seguida pelo isolamento formal de *S. aureus* por Rosenbach [168].

Os *S. aureus* são bactérias Gram-positivas não móveis e que apresentam forma de cocos. São aeróbios facultativos e podem crescer a temperaturas entre 15 e 45 °C e a concentrações de cloreto de sódio que podem chegar aos 15%. Uma característica que as permite distinguir de outras espécies de *Staphylococcus* é o facto de serem coagulase positivas [169].

### 4.2 Patogenicidade

*S. aureus* é reconhecido como um patógeno importante das doenças humanas [170]. É um microrganismo comensal responsável por colonizar as fossas nasais (reservatório primário), as axilas, vagina, faringe e superfícies da pele com lesões. Assim, existe risco de infeção quando há uma rutura das barreiras cutâneas ou mucosas o que permite o acesso da bactéria aos tecidos e à corrente sanguínea e permite que este atue como um patógeno humano oportunista [171]. Pessoas com instrumentos médicos invasivos (como cateteres) e com o sistema imunitário comprometido são vulneráveis a infeções por *S. aureus* [167].

#### 4.2.1 *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes

A descoberta pioneira da penicilina que deu início à era dos antibióticos, trouxe algum alívio para o aumento de casos de infeções devidas a *S. aureus* que se verificava naquela altura. No entanto, pouco após a introdução da penicilina no mercado, nos anos 1940, o seu uso levou à seleção de *S. aureus* com fenótipo de resistência para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Esta resistência, mediada pela produção de uma  $\beta$ -lactamase bacteriana, teve uma proliferação na comunidade [172].

Em 1950, mais de 50% dos isolados de *S. aureus* apresentavam resistência à penicilina. Assim, em 1959, foi introduzido um novo antibiótico semissintético derivado da penicilina - a meticilina - mas, pouco tempo depois surgiram relatos de estirpes de *S. aureus* que adquiriram resistência a este novo antibiótico e às quais se deu o nome de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) [173].

As estirpes MRSA adquiriram resistência pela incorporação do gene *mecA*. Este gene codifica para uma proteína de ligação à penicilina específica, a PBP2a, que apresenta baixa afinidade para a maioria das penicilinas. Ao contrário da resistência mediada por uma  $\beta$ -

lactamase, o gene *mecA* confere resistência de largo espectro que impede a ação de todos os antibióticos pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos [174].

O gene *mecA* localiza-se num elemento móvel genético, a cassete cromossomal *mec* (SCC*mec*), teorizando-se que foi adquirida por transferência horizontal a partir de outra espécie de *Staphylococcus* [175]. A resistência dos MRSA aos  $\beta$ -lactâmicos é devida, principalmente, ao gene *mecA*, no entanto, existe a expressão de outros genes e de fatores auxiliares da biossíntese do peptidoglicano que também apresentam um papel importante para a existência do fenótipo MRSA [176].

Dez anos após a descrição das estirpes MRSA, estas foram identificadas como responsáveis por surtos hospitalares em várias partes do mundo, passando a ser referidas como MRSA associadas aos cuidados de saúde (HA-MRSA). No entanto, observou-se uma mudança na epidemiologia das MRSA quando se identificaram clones MRSA causadores de infeções em indivíduos saudáveis da comunidade e sem qualquer contacto com o meio hospitalar. Estas são referidas como MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA). Por volta dos anos 2000, as MRSA foram também observadas associadas à pecuária (LA-MRSA) [177].

As estirpes MRSA podem causar uma variedade de infeções como: infeções da pele e tecidos moles, pneumonia, infeções osteoarticulares, síndrome do choque tóxico e bacterémia que se pode complicar em endocardite ou sépsis [167].

#### 4.2.2 Epidemiologia

A distribuição geográfica do fenótipo MRSA é global e apresenta uma prevalência variável. Existe maior prevalência em zonas da América (como a Argentina e os Estados Unidos) e da Ásia (como Coreia do Sul e a Índia), e menor prevalência na região da Escandinávia [178].

### 4.3 Fatores de Virulência

*S. aureus* expressa uma gama variada de fatores de virulência, incluindo toxinas, fatores superficiais e enzimas que têm como principal objetivo promover a invasão dos tecidos e a defesa do sistema imunitário do hospedeiro [172].

A maioria dos genes que conferem virulência estão associados a elemento genéticos móveis, pelo que a sua combinação difere entre clones e até mesmo entre estirpes relacionadas [177].

#### 4.3.1 Início da Infeção

As proteínas de superfície características de *S. aureus*, como as proteínas de ligação à fibronectina A e B (FnBPA e FnBPB), fatores de aglutinação A e B (ClfA e ClfB) e a adesina de ligação ao colagénio (Cna), ligam-se às proteínas da matriz extracelular promovendo a ligação das bactérias ao tecido e aí a sua multiplicação [179].

A capacidade que *S. aureus* tem de aderir e criar biofilmes em materiais artificiais como plásticos e metais torna este microrganismo uma causa frequente de infeções associadas ao uso de cateteres ou de pneumonias associadas a ventiladores em contexto hospitalar. Os biofilmes

são comunidades organizadas e funcionais de células microbianas que estão aderidas a uma superfície, biótica ou abiótica, e que estão envolvidas por uma matriz extracelular autoproduzida. Esta matriz funciona como uma barreira entre as células e os componentes extracelulares, protegendo as células do ataque do sistema imunitário do hospedeiro e da ação de alguns antibióticos, pelo que beneficia a colonização, propagação e infecção por *S. aureus* [180].

#### 4.3.2 Formação do Abscesso

As coagulases de *S. aureus* causam a formação de uma pseudo cápsula de fibrina que envolve a bactéria e leucócitos polimorfonucleares infiltrados e que previne o influxo de mais leucócitos [181].

As bactérias que são fagocitadas pelos leucócitos podem sobreviver através da atuação de mecanismos de eliminação dos leucócitos ou de toxinas. Muitos clones de MRSA associados à comunidade produzem uma série de componentes, como um péptido formador de poros, toxinas e leucocidinas, que atuam especificamente contra a membrana dos leucócitos do hospedeiro levando à formação de poros e conseqüentemente morte celular [182].

A resposta inflamatória induzida pelos leucócitos é aumentada por toxinas libertadas por *S. aureus*. Estas ligam-se ao complexo de histocompatibilidade classe II ativando células T que vão causar uma hiperinflamação [177].

#### 4.3.3 Infecção Sistémica

Os abscessos podem-se romper e libertar pus e bactérias, quer para a superfície da pele promovendo a transmissão do patógeno, quer para o sangue e causar bacterémia.

*S. aureus* tem a capacidade de aderir às superfícies endoteliais e plaquetas, o que pode levar a endocardite, promover a formação de abscessos metásticos ou induzir a entrada de bactérias nas células endoteliais tornando os microrganismos difíceis de ser alcançados pelo sistema imunológico do hospedeiro ou antibióticos [177].

## 5. Impacto das Ações Humanas no Desenvolvimento e na Propagação de Resistência

---

### 5.1 Uso Inadequado de Antibióticos

#### 5.1.1 Falta de Conhecimento por Parte da Comunidade

O conhecimento (ou falta dele) e as crenças da comunidade perante os antibióticos e a resistência a antimicrobianos são determinantes para o uso incorreto de antibióticos. Muitas vezes, as pessoas apresentam concepções erradas ou falta de compreensão acerca da resistência aos antibióticos, chegando alguns mesmo a acreditar que, individualmente, não contribuem para o aparecimento de resistência ou que são os humanos, ao invés das bactérias, que se tornam resistentes. Outros acreditam que não contribuem para o desenvolvimento de resistência e atribuem esse problema às ações de outros, chegando mesmo a crer que apresentam baixo risco de serem atingidos por este problema [183,184].

Existe assim, uma necessidade enorme de aumentar a conscientização sobre o uso de antibióticos e a resistência entre a população mundial. Por exemplo, de acordo com o Eurobarómetro de 2018, cerca de 48% dos europeus acha que os antibióticos atuam contra vírus e 28% que são eficazes contra constipações. Também, apenas 33% dos europeus admitiu receber informação sobre o uso correto de antibióticos, sendo esta dada principalmente por médicos. No entanto, destes, cerca de 70% admite que essa informação não alterou a sua visão relativamente ao uso de antibióticos [185].

#### 5.1.2 Automedicação

O acesso aos antibióticos sem apresentação da prescrição médica potencia o uso irracional de antibióticos uma vez que está associado à falta de um diagnóstico apropriado e correto levando assim ao desenvolvimento e propagação da resistência aos antibióticos. Também a obtenção de antibióticos através da internet ou por compras noutros países contribui para a automedicação pelo utente [186]. De acordo com o Eurobarómetro de 2018, cerca de 93% dos europeus obtiveram antibióticos a partir de um médico e apenas 7% os obtiveram sem prescrição médica [185].

Outro caso que contribui para este problema ocorre quando o utente não adere à terapia ou quando a quantidade prescrita excede a duração do tratamento e existe a sobra de antibióticos, possibilitando que estes sejam usados uma segunda vez num ato de automedicação [187].

Mesmo assim deve-se tentar reduzir estes números ao máximo uma vez que a automedicação, o uso de antibióticos sem que haja um guia prévio da terapia, está na base, não só do uso de dosagens incorretas ou desnecessárias de antibióticos, mas também de um tratamento prolongado ou repetido com antibióticos. Estes fatores promovem a seleção e emergência de bactérias resistentes numa microbiota bacteriana normal [186].

### 5.1.3 Atitude dos Prestadores de Cuidados de Saúde

O prescritor tem o poder de decisão no que diz respeito ao uso de antibióticos e à seleção dos mesmos. Assim, os seus conhecimentos, atitudes e a maneira como encaram o uso de antibióticos e a resistência a estes tem influência na decisão e qualidade da prescrição.

A análise de vários estudos quantitativos realizados sobre a prescrição de antibióticos permitiu listar uma série de fatores que podem ter influência na prescrição por parte do médico como: fatores sociodemográficos (género, especialidade médica, experiência clínica, anos de prática, educação e formação), algumas atitudes por parte clínico (complacência para com o utente, receio de futuras complicações ou de perder o utente, ignorância, indiferença, responsabilidade, entre outras), fatores relacionados com o utente (idade, existência de outras condições clínicas, sinais, sintomas, fatores económicos, desejo por um tratamento rápido, entre outros), fatores relacionados com o sistema de saúde, entre outros [188].

Um estudo em Espanha mostrou que uma atitude complacente para com os utentes, o receio do aparecimento de complicações como consequência das infeções e falta de conhecimento sobre a resistência aos antibióticos são os fatores que mais têm influência na prescrição de antibióticos. Verificou-se que este receio está relacionado com uma tendência para a prescrição de antibióticos de largo espetro e para casos para os quais estes não são indicados. A complacência está associada com as prescrições, na medida em que o clínico tenta alcançar as expectativas do utente com a prescrição de antibióticos, tentando assim manter uma boa relação com o mesmo [189].

Foi também demonstrado numa revisão sistemática do conhecimento e crenças dos clínicos, que estes acreditam e reconhecem que a resistência aos antibióticos é um problema real e sério, consequência do uso de antibióticos, mas que não atinge o seu universo. Havia muito mais clínicos que acreditavam que o problema era a nível nacional ou global do que ao nível da sua prática clínica [190].

### 5.1.4 Falta de Formação dos Prestadores de Cuidados de Saúde

A falta de treino no que diz respeito à prescrição de antibióticos durante a educação e até mesmo durante o início da profissão pode contribuir para a sua prescrição inadequada. Uma boa prescrição de antibióticos ajuda a reduzir o desenvolvimento de resistência aos antibióticos e custos de saúde bem como taxas de mortalidade. A Organização Mundial de Saúde também reforçou que um bom treino de prescrição durante os anos de estudo promove a prescrição e o uso correto de antibióticos [191].

Um inquérito de 2018 sobre a autoavaliação que os estudantes de medicina de 29 países europeus realizaram no que diz respeito à prescrição de antibióticos indicou que, em média, 66,1% mostram a necessidade de mais educação sobre o uso de antibióticos. Notou-se também uma correlação entre o sentimento de maior preparação e educação neste tópico com taxas mais elevadas de bactérias não suscetíveis a antibióticos [192].

Um estudo que teve como objetivo avaliar a capacidade de prescrição de antibióticos por alunos europeus do último ano de medicina, mostrou que, de forma geral, 52,7% das terapias apresentadas foram consideradas apropriadas, mas que no que diz respeito a duas doenças

infeciosas comuns (bronquite aguda e pneumonia adquirida na comunidade) quase metade (47%) das terapias prescritas foram consideradas inapropriadas, das quais 49% se consideraram como potencialmente prejudiciais para o utente. Estes resultados sugerem uma carência na educação acerca do uso e prescrição de antibióticos que pode ter consequências ao nível do desenvolvimento de resistência [191].

### 5.1.5 Influência da Indústria Farmacêutica

Estima-se que as companhias farmacêuticas gastem à volta de 57,5 mil milhões de dólares em publicidade e divulgação só nos Estados Unidos, alegando que esta promoção fornece informação científica e educacional aos clínicos. No entanto, existe alguma evidência de que a divulgação farmacêutica pode ter influência no aumento das prescrições irracionais. Os representantes de vendas são treinados para persuadir e influenciar, pelo que a criação de relações com os médicos pode levar à influência na qualidade e quantidade das prescrições [193].

Uma revisão de vários estudos sobre este tópico publicada em 2010 mostrou que a exposição a informação proveniente das companhias farmacêuticas pode estar associada a uma maior frequência, mas menor qualidade da prescrição e a mais custos [193].

### 5.1.6 Falta de Diagnóstico Rápido e Suficiente ou Dados Sobre a Suscetibilidade aos Antibióticos

A realização insuficiente e atempada de testes de diagnóstico para que rapidamente se identifique o microrganismo patogénico e o seu perfil de suscetibilidade, informação que guia a prescrição e reduz a necessidade de utilizar antibióticos de largo espectro, é um dos principais problemas por detrás da prescrição incorreta de antibióticos. A prática usual é a prescrição de um antibiótico de largo espectro que, depois de se obter a identificação da bactéria, pode ou não ser alterado para um de espectro mais estreito [194].

Nem sempre existem métodos de diagnóstico rápidos disponíveis ou então a sua disponibilidade não é uma certeza de uma prescrição adequada. Existe uma grande limitação destes testes na determinação de perfis de suscetibilidade completos uma vez que estes podem estar também dependentes e devem ser contextualizados de acordo com os guias de prescrição da região e da prevalência do patógeno [195].

## 5.2 Sistemas de Tratamento de Águas Residuais

Os sistemas de água residual são uma fonte de seleção de bactérias resistentes e da propagação de mecanismos de resistência devido à presença de antibióticos, metais pesados, bactérias resistentes e genes de resistência [196].

O descarte de resíduos contaminados com antibióticos e outros resíduos médicos provenientes de hospitais, por exemplo, facilita a contaminação do solo e da água do solo com resíduos de antibióticos. Aqueles antibióticos que não se degradam quando chegam ao ambiente

acumulam-se, podendo, mais tarde, detetar-se altas concentrações em amostras de água e sedimentos [197], tal como aconteceu no rio Liuxi na China [198]. Foi também mostrado, no Canadá, a presença abundante de genes de resistência a antibióticos em sistemas de tratamento de água para consumo e nos sistemas de distribuição. Verificou-se, inclusive, que a água obtida da torneira das áreas residenciais abastecidas continha genes de resistência contra classes de antibióticos considerados clinicamente importantes [199].

O mau tratamento do esgoto também facilita a propagação e disseminação de genes de resistência e bactérias resistentes [200].

Este é um problema que deve ser tido em consideração quando se pensa em diminuir as taxas de bactérias resistentes e a sua propagação uma vez que mesmo baixas concentrações de antibióticos são suficientes para criar seletividade para bactérias altamente resistentes [201].

### 5.3 Indústria de Produção de Antibióticos

A indústria de produção de antibióticos é responsável pelo despejo de concentrações significativas de antibióticos para o ambiente, poluindo tanto a água como o solo e o ar [200,202].

Na Índia, por exemplo, existem aproximadamente 100 fábricas de produção farmacêutica que estão todas ligadas a um único sistema de tratamento de águas residuais. Foi reportado em 2009 que efluentes dessa estação de tratamento alcançaram não só águas superficiais próximas, como lagos, bem como o solo e depósitos de água potável (como poços) e foram documentados valores de antibióticos que excediam as concentrações terapêuticas no plasma [203].

As altas concentrações de antibióticos criam um ambiente favorável à transferência de genes de resistência entre diferentes espécies, contribuindo para a sua propagação. É também de notar que já foi detetado um alto número de bactérias multirresistentes em sistemas de tratamento, estas incluem bactérias do ambiente, bactérias patogénicas para o humano e até bactérias comensais [204,205].

### 5.4 Resíduos Humanos e Animais

A administração de antibióticos a humanos ou animais resulta na sua excreção pela urina ou fezes o que resulta na contaminação do ambiente [206]. Também a comida dos animais contém alguns antibióticos que se podem infiltrar diretamente no solo ou serem excretados para o solo depois de serem consumidos [207].

Os resíduos animais e fertilizantes também podem ser uma fonte de genes de resistência e bactérias que infiltram o solo e a água do solo [207]. Um estudo na Holanda, revelou que mais de 30% das fezes de suínos e bovinos analisadas apresentavam resíduos de, pelo menos, um antibiótico [208].

## 5.5 Bactérias comensais

As bactérias comensais contribuem para o reservatório de genes de resistência presente no seu habitat, existindo até estudos que evidenciam a transferência de genes de resistência aos antibióticos entre bactérias comensais e bactérias patogênicas no intestino humano [209].

A *E. coli* fecal (uma bactéria comensal) tem servido como um indicador da transmissão de genes de resistência aos antibióticos entre patógenos na comunidade [210].

Num estudo realizado com crianças saudáveis da Bolívia e do Peru, em que foram testadas amostras de fezes, detetou-se a presença de genes de resistência aos antibióticos em *E. coli* comensal [211]. Foram também isoladas estirpes *E. coli* resistentes a antibióticos da microbiota fecal de recém-nascidos (com menos de um mês de idade) e que não tinham historial de terapia com antibióticos [212].

Estes exemplos realçam os riscos que as bactérias comensais portadoras deste tipo de genes de resistência podem ter na transmissão de resistência e na sua velocidade de propagação [211,212].

## 6. Impacto da Resistência dos Antibióticos na Vida Humana

---

A emergência e propagação de patógenos resistentes à terapia e de novos mecanismos de resistência continua a ameaçar a capacidade de tratar infecções comuns.

Em 2019 a Organização Mundial de Saúde identificou 32 antibióticos que se encontravam em desenvolvimento e que permitiam combater a lista de patógenos prioritários, no entanto destes apenas 6 foram considerados inovadores. Isto mostra que os antibióticos se estão a tornar cada vez menos eficientes e que existe uma urgência para a introdução de novos antibióticos [152].

Para além de ter consequências graves no tratamento de infeções, a resistência aos antibióticos também apresenta consequências económicas relacionadas com estadias prolongadas nos hospitais e a necessidade de cuidados de saúde mais caros e intensivos [152].

Os impactos clínicos e económicos da resistência aos antibióticos têm uma relação próxima.

### 6.1 Impacto Clínico e Económico

Uma análise publicada em 2019 estimou que, durante esse ano, existiram 4,95 milhões de mortes devidas a doenças nas quais a resistência aos antimicrobianos teve um papel importante. Deste total de casos, cerca de 1,27 milhões são inteiramente atribuídos a resistência, o que quer dizer que a resistência aos antimicrobianos foi causa de um maior número de mortes do que doenças como a SIDA ou a malária. [213].

Uma revisão da resistência aos antimicrobianos publicada em 2016 estima que, se não houver mudanças no sentido de melhorar este problema, a resistência pode ter um custo de até 10 milhões de vidas cada ano até 2050 [214].

À medida que os antibióticos disponíveis se tornam menos eficazes, aumentam os riscos associados a muitos dos tratamentos que destes estão dependentes. Este problema vai pôr em causa, por exemplo, a viabilidade de quimioterapias, transplantações de órgãos e cirurgias invasivas. Os doentes entubados já são alvo de altas taxas de infeções causadas por microrganismos, incluindo aqueles resistentes à terapia, pelo que, este risco de infeção apenas vai aumentar no futuro se as opções de tratamento para estes casos esgotarem [214].

O tratamento de doentes com terapêuticas que podem não ser eficientes tende a resultar em internamentos mais longos que podem até passar pela unidade de cuidados intensivos ou camas de isolamento. Também a ocorrência de surtos hospitalares por bactérias resistentes pode levar ao fecho de parte do hospital. Todas estas situações de tratamentos intensivos e aumento da procura de recursos estão associadas a elevados custos, impacto monetário direto da resistência aos antibióticos nos cuidados de saúde, e que se prevê poder chegar a valores entre 300 mil milhões e 1 bilião de dólares anualmente até 2050 [215].

Globalmente existe uma disparidade substancial no padrão da resistência aos antibióticos, na medida que diferentes países experienciam diferentes tipos de obstáculos. Esta variação está relacionada com as diferenças no uso de antibióticos, sendo que um uso impróprio e excessivo contribui para o desenvolvimento de resistência [216]. Assim, pensa-se que o custo total da

resistência aos antibióticos no globo seja extremamente elevado, mas com diferenças entre cada país.

O World Bank indica que a resistência aos antibióticos tem a capacidade de elevar a taxa de pobreza e ter um maior impacto nos países em desenvolvimento do que no resto do mundo, aumentando as diferenças entre os países em desenvolvimento e os países desenvolvidos. Para além disso, a resistência aos antibióticos tem uma grande influência no trabalho laboral devido à falta de produtividade causada pela doença ou pela morte prematura. Existe não só uma diminuição da classe trabalhadora, mas também uma diminuição da qualidade do capital humano do país [215].

De acordo com um estudo onde foi criado um modelo teórico com o objetivo de estimar os impactos económicos da resistência aos antimicrobianos na mão de obra no futuro, se não existir nenhuma alteração no padrão de resistência nos próximos dez anos, então a idade da população trabalhadora vai diminuir em dois anos, sendo esta uma mudança que vai ser mais pronunciada na Eurásia. [215]

O relatório do World Bank publicado em 2017 também refere que o produto interno bruto anual global poderá diminuir entre 1,1% a 3,8% como consequência da resistência aos antimicrobianos [217]. A verdade é que se não existir alteração das tendências da resistência aos antimicrobianos então a perda global pode ser de 28 mil milhões de dólares em dez anos. De acordo com este modelo, os países pertencentes à União Europeia e à Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económicos (OCDE) são aqueles previstos para perder mais a nível económico [215].

As trocas globais também vão ser severamente afetadas se este problema persistir. O relatório do World Bank mostra que as exportações globais podem sofrer um decréscimo significativo (entre 1,1% a 3,8%) até 2050, sendo isto uma consequência dos efeitos, já referidos, da resistência aos antimicrobianos na população laboral [215,217].

É de referir que a resistência aos antibióticos também tem impactos ao nível do setor da pecuária. Estes efeitos serão principalmente devido ao aumento das mortalidade e morbilidade dos animais, consequência de infeções devidas a microrganismos resistentes e aos quais as opções de terapia são ineficazes. Os impactos vão ser principalmente a diminuição da produção e troca de animais o que resulta no aumento dos preços das proteínas de origem animal [215].

## 6.2 Estratégias para Melhorar o Problema da Resistência aos Antibióticos

Ao longo dos anos têm existido esforços não só para melhorar a atividade de antibióticos já disponíveis, mas também para a descoberta de novos agentes que possam auxiliar na diminuição do desenvolvimento da resistência. No entanto, a descoberta de novos antibióticos tem sido deficiente nos últimos anos pelo que se tem verificado uma emergência de bactérias resistentes a antibióticos incluindo os antibióticos de última linha [216].

Grande parte das soluções que podem ser apresentadas para melhorar esta situação estão nas mãos dos políticos e respetivos governos. Estas decisões devem ter em conta a situação de

outros países e ser tomadas de maneira coordenada e a nível internacional, uma vez que este é um problema que não consegue ser resolvido por um único país.

As mudanças têm de existir principalmente ao nível da toma e prescrição de antibióticos de maneira a se poder preservar aqueles que já existem e diminuir a necessidade de descobrir novos antibióticos. Para além dos governos, também os principais setores responsáveis pelo consumo de antibióticos, como os sistemas de saúde, a indústria farmacêutica e a indústria da pecuária e agricultura, devem assumir a responsabilidade [214].

Algumas das medidas (recomendadas) que devem ser tomadas para combater a resistência aos antibióticos relacionam-se com a criação de campanhas globais de consciencialização pública. Por exemplo, sensibilizar a população para a melhoria da higiene como prevenção da propagação da infeção, redução do uso desnecessário de antibióticos na agricultura para prevenção da sua disseminação para o ambiente, melhorar a supervisão e o registo dos padrões de resistência e de consumo de antibióticos tanto nos humanos como nos animais, promover diagnósticos rápidos que previnam o uso desnecessário de antibióticos, promover o desenvolvimento e uso de vacinas e outras terapias alternativas, melhorar o financiamento e o reconhecimento dos trabalhadores da área das doenças infecciosas e, por fim, incentivar o financiamento para o desenvolvimento de novas terapias e a melhoria daquelas já existentes [214].

## 7. A Resistência aos Antibióticos e a Pandemia

---

No pico da pandemia do COVID-19, os sistemas de saúde da maior parte do globo encontravam-se esgotados, esta situação levou a que fosse necessário colocar de parte outros problemas de saúde pública [218]. Por exemplo, existiu a interrupção de alguns tratamentos, como tuberculose, o que pode ser um potenciador da seleção para a resistência [219].

Muitos dos problemas que foram ignorados durante a pandemia vão ser exacerbados nos anos que se seguem e podem ter consequências ainda mais graves do que aquelas que se verificavam na era pré COVID-19 [218]. Segundo o Centro para o Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) a pandemia do COVID-19 teve impacto em principalmente quatro ações de combate à resistência aos antibióticos: recolha de dados estatísticos, prevenção de infeções, controlo do uso de antibióticos e investimento na terapêutica [220].

### 7.1 Impacto na Recolha de Dados Estatísticos de Resistência aos Antibióticos

A recolha deste tipo de dados diminuiu bastante durante a pandemia COVID-19 devido às mudanças ocorridas no que diz respeito ao tratamento e testagem de doentes com este tipo de infeções e ao nível da disponibilidade das instituições de saúde para receber estes utentes [220].

### 7.2 Impacto na Prevenção de Infeções

A pandemia COVID-19 enfraqueceu algumas práticas relacionadas com a prevenção e controlo de infeções. Para além disso, durante a pandemia existiu um maior número de doentes a necessitar o uso de cateteres e ventiladores, fatores de risco para a propagação de infeções nosocomiais, que associadas a desafios encontrados ao nível da falta de material de laboratório, falta de pessoal técnico e às estadias mais longas dos doentes nos hospitais, apresentam um impacto negativo e dificultam a prevenção, propagação e cura destas infeções [220].

### 7.3 Impacto no Uso de Antibióticos

Durante a pandemia COVID-19 a prescrição de antibióticos a doentes com COVID-19 passou a ser comum. Esta situação foi verificada principalmente em doentes hospitalizados onde se verificou que, entre março e outubro de 2020, aproximadamente 80% dos doentes hospitalizados com COVID-19 foram medicados com antibióticos [220]. Este é o reflexo da dificuldade inicial de diagnóstico da COVID-19 uma vez que esta é uma patologia que apresenta sintomas semelhantes à pneumonia bacteriana e que não apresenta terapia antiviral com eficácia confirmada, pelo que existiu a necessidade por parte dos prestadores de cuidados

de saúde de adotar estratégias empíricas para o tratamento de doentes com COVID-19, especialmente aqueles em estado crítico [218].

No caso de utentes externos, os valores do uso de antibióticos diminuíram em 2020 quando comparados com os valores de 2019, provavelmente devido à diminuição do foco do sistema de saúde por utentes não infetados com COVID-19 e também devido à diminuição do contágio de outro tipo de doenças respiratórias que podem ser confundidas com infeções bacterianas e assim levar à prescrição desnecessária de antibióticos.

Apesar de se ter verificado uma redução global do uso de antibióticos, entre 2020 e dezembro de 2021, existiu um aumento de alguns antibióticos específicos como a azitromicina e a ceftriaxona [220].

## 7.4 Investimento na Terapia

A pandemia COVID-19 realçou a importância de existir um fim à propagação dos microrganismos e mostrou-nos que o tratamento após a infeção não é nem deve ser tomado como a única solução para o combate de infeções.

Esta é uma lição que deve ser aplicada ao nível da terapia de infeções provocadas por microrganismos resistentes devendo existir um maior investimento não só ao nível do desenvolvimento de novos antimicrobianos, mas também de novas vacinas que serão usadas principalmente como uma medida preventiva [220].

## 7.5 Coinfeções e Infeções Secundárias

As coinfeções bacterianas, ou seja, infeções que estão presentes no momento que o utente é admitido no hospital, são uma complicação frequente de infeções virais do trato respiratório [221]. Durante a pandemia do vírus influenza H1N1 em 2009, foi reportado que cerca de 18 a 30% dos utentes a necessitar de admissão na unidade de cuidados intensivos apresentavam uma coinfeção bacteriana. No caso de outras infeções causadas por outros coronavírus esta prevalência não se encontra bem definida, no entanto, estima-se que 11% dos utentes com SARS-CoV-1 apresentem coinfeção com predominância para infeções secundárias [221].

As admissões hospitalares aumentam o risco de infeções nosocomiais e a transmissão de microrganismos multirresistentes o que, conseqüentemente, resulta no aumento do uso de antimicrobianos [219]. Isto é comprovado por um estudo realizado nas unidades de cuidados intensivos de 88 países nas quais se verificou que, apesar de apenas 54% dos doentes apresentarem suspeita ou confirmação de coinfeção bacteriana, 70% destes receberam, pelo menos, um antibiótico como tratamento ou como profilaxia antimicrobiana [222].

A existência de factos que comprovam a importância das coinfeções bacterianas em doentes com infeções virais e a dificuldade em excluir uma coinfeção bacteriana ou de identificar os sintomas como sendo devido à COVID-19 são fatores que podem ter tido um papel importante durante a primeira fase da pandemia, principalmente ao nível das prescrições de antibióticos [218,223]. Uma revisão de diversos estudos publicados identificou que dos 72% dos doentes

hospitalizados com COVID-19 que receberam antibióticos, apenas 8% necessitavam efetivamente do mesmo [224].

## 8. O Futuro dos Antibióticos

---

Como já foi referido nos capítulos anteriores, o futuro da medicina está dependente da existência de antibióticos eficazes contra os diversos tipos de patógenos, incluindo aqueles que possuam algum tipo de resistência [225].

Entre 1930 e 1962, foram produzidas mais de vinte novas classes de antibióticos [131]. No entanto, desde então, e apesar de se continuar a procurar e a desenvolver novas terapias que combatam a resistência, a verdade é que a descoberta de novos antibióticos continua sem conseguir acompanhar as taxas de resistência [225]. A diminuição da introdução de novos antibióticos e a emergência da resistência aos antibióticos em conjunto com a pandemia da COVID-19 alertam-nos para a urgência existente na criação de planos de ação e alternativas terapêuticas que resultem no melhor tratamento das doenças infecciosas [226].

Naturalmente, e como já mencionado, o futuro da terapia antimicrobiana não está apenas dependente da introdução de novas formas de terapia, sendo também determinado pela melhoria na testagem e análise de dados relativos à suscetibilidade bacteriana, na melhoria dos sistemas de administração de medicamentos, na redução dos efeitos secundários das diferentes terapias e da consciencialização do papel dos prescritores e dos prescritos de antibióticos em “guardar” os antibióticos para as gerações futuras [129].

A realidade é que os antibióticos são uma categoria de medicamentos especial por ser a única que demonstra perda de eficácia ao longo do tempo [227]. Assim, deve-se tomar medidas com o intuito de manter a eficácia dos antibióticos atualmente utilizados na prática clínica e investir na descoberta de outros novos, contribuindo assim para a luta global contra a resistência. No entanto, e apesar de esta não ser a única solução para esta pandemia silenciosa, é necessário mudar o rumo da descoberta e procurar terapias inovadoras [226].

São poucas as novas classes de antibióticos que foram descobertas desde 1960 e são limitados os novos agentes que estão atualmente em desenvolvimento [228]. No entanto, nos últimos anos, o futuro da descoberta dos antibióticos tem-se mostrado promissor com a utilização de técnicas genéticas que auxiliam a descoberta de novos compostos naturais que apresentam bioatividade diversa [126]. Para além dos antibióticos tradicionais, tem-se também apostado em alternativas terapêuticas que incluem, por exemplo: bacteriófagos, compostos antivirulentos, probióticos, vacinas, estimulação do sistema imunitário, péptidos antimicrobianos, terapias anti biofilme, anticorpos, entre outros [229].

### 8.1 Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que infetam bactérias através do reconhecimento de recetores específicos que existem na superfície da célula. Durante o seu ciclo de vida os bacteriófagos apoderam-se da maquinaria celular da bactéria infetada e usam-na para se replicar o que, no momento da libertação das novas unidades de vírus, acaba por causar a lise da célula bacteriana infetada [230].

Os bacteriófagos são microrganismos biologicamente diversos e abundantes o que os torna, não só, numa fonte de terapia antibacteriana, mas também, possíveis descontaminantes, controlos de infeção, detenção e diagnóstico [231].

A terapia fágica, como também é denominada, apresenta inúmeras vantagens em relação à terapia antibiótica, por exemplo: atua em infeções causadas por patógenos multirresistentes e é eficaz tanto contra bactérias Gram-positivas como Gram-negativas; apresenta uma especificidade elevada para a bactéria que infeta pelo que tem pouco efeito na microflora normal e é relativamente livre de efeitos secundários; os bacteriófagos são fáceis de isolar e seleccionar o que reduz os seus custos; podem codificar enzimas que degradam biofilmes e assim permitir o acesso de outros antimicrobianos; é uma terapia relativamente segura e com baixa imunogenicidade; pode ser combinada em cocktails fágicos, o que permite alcançar uma maior diversidade de patógenos [232,233].

Um estudo investigou o efeito terapêutico dos fagos no tratamento de infeções pulmonares causadas por isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes em ratos. Foram isolados cerca de trinta bacteriófagos dos quais quatro foram descritos: SH-Ab 15599, SH-Ab 15708, SH-Ab 15497 e SH-Ab 15519. O cocktail dos quatro bacteriófagos mostrou-se efetivo contra 88% dos isolados de *A. Baumannii* e para o bacteriófago SH-Ab 15519 foi determinada uma enzima como a causa da degradação exopolisacarídea bacteriana, caracterizada por absorção rápida e estabilidade elevada para intervalos de pH e temperatura largos [234].

Num outro estudo realizado em humanos adultos com infeções do trato urinário complicadas verificou-se, após terapia fágica, a normalização da urina e um perfil de segurança do tratamento favorável [235].

Foi também demonstrado num estudo que, um cocktail de bacteriófagos foi capaz de reduzir significativamente os níveis de uma estirpe de *E. coli* enterohemorrágica em ratos infetados. Verificou-se também que a eficácia da terapia fágica foi aproximada aquela observada na terapia com ampicilina e não deixou impactos na microbiota normal do intestino ao contrário do que se comprovou com o antibiótico. Outro aspeto examinado foi que a terapia fágica não teve consequências aparentes ao nível do peso dos ratos enquanto que para o antibiótico foi observado uma perda de peso bastante significativa [236].

Apesar de muitos estudos reportarem o potencial e a segurança do uso clínico dos bacteriófagos para o tratamento de infeções bacterianas estes apresentam algumas limitações e questões que devem ser respondidas. Algumas bactérias podem possuir resistência para os bacteriófagos [237], ou então os bacteriófagos podem ter o potencial de transferir genes de resistência ou virulência de umas bactérias para as outras [238]. A imunogenicidade dos bacteriófagos também é uma questão que deve ser avaliada uma vez que se forem reconhecidos pelo sistema imunitário como uma potencial ameaça podem ser removidos da circulação sanguínea resultando numa concentração menor que a aquela determinada para a sua eficácia [239].

No final do ciclo celular dos bacteriófagos estes induzem a lise de um elevado número de células bacterianas *in vivo*, podendo este processo conduzir à libertação de endotoxinas e superantígenos de bactérias Gram-negativas. Esta libertação simultânea e considerável pode induzir a cascata de inflamação e conseqüentemente levar à falência de múltiplos órgãos [240]. Para além disso os bacteriófagos apresentam um espectro de alvos bacterianos relativamente limitado, pelo que, apesar de alguns bacteriófagos serem fáceis de obter para a maioria dos

patógenos (como *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), para outras espécies têm-se mostrado difíceis de isolar (como *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile*) [240].

Ainda assim, a aplicação da terapia fágica é uma opção que deve ser considerada como alternativa aos antibióticos, especialmente no que diz respeito ao tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes, já que esta pode ser a única alternativa para estes utentes.

## 8.2 Inibição da Virulência Bacteriana

A virulência é caracterizada pela capacidade que um microrganismo apresenta para causar dano no hospedeiro e resulta de interações complexas entre o patógeno e o hospedeiro. Um fator de virulência é definido como o atributo genético que aumenta a possibilidade de o patógeno causar doença no hospedeiro [241]. Alguns exemplos de fatores de virulência incluem enzimas, toxinas, exopolisacarídeos, sistemas de aquisição de metais, sistemas sinal, e estruturas da superfície celular como lipopolisacarídeos, cápsulas e glico e lipoproteínas. Tendo isto em consideração e como resposta à atual resistência aos antibióticos iniciou-se o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antivirulência [242].

Os sistemas de secreção das bactérias criam poros nas membranas celulares do hospedeiro permitindo assim a secreção de proteínas de virulência para o citosol, o que interfere com as funções normais da célula hospedeira e ajuda a persistência da bactéria [242,243].

Estes sistemas apresentam estruturas, funções e síntese altamente conservadas entre diferentes estirpes da bactéria e, para além disso, as proteínas que os constituem estão situadas na superfície celular o que as torna acessíveis. Assim, inibidores destes sistemas podem apresentar a capacidade de atacar diferentes patógenos simultaneamente. Adicionalmente, como apenas bactérias patogénicas expressam este tipo de sistemas, a microbiota normal não patogénica não será afetada. Para além disso, como a inibição destes sistemas não influencia a sobrevivência da bactéria, acredita-se que a pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência seja baixa [242].

Outra estratégia para combater a virulência é atacando os biofilmes. Os biofilmes conferem proteção às células que o constituem da ação tóxica dos antibióticos, raios UV, acidez, toxicidade metálica, ao sistema imunitário e fagócitos e são ainda um meio propício para a ocorrência de transferência horizontal de genes e mutações [244]. Assim, é importante desenvolver estratégias anti biofilme que minimizem ou erradiquem este tipo de infecções [245].

Foi determinado que o óxido nítrico apresenta a capacidade de dispersar o biofilme formado por *P. aeruginosa* [246], no entanto, apresenta desafios clínicos ao nível da citotoxicidade, falta de especificidade para infecções provocadas por biofilmes e custo [247].

Durante a infecção bacteriana, o hospedeiro humano sequestra iões metálicos, como o ferro, para evitar que este seja adquirido pelos sideróforos dos patógenos [248], uma vez que é um metal fundamental ao processo celular por ser o cofator de diversas enzimas essenciais [249]. A produção de sideróforos como fatores de virulência é comum a várias bactérias como *M. tuberculosis*, *B. anthracis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *A. Baumannii* [250].

A baulacimina A é um inibidor natural da síntese dos sideróforos produzido por *Streptomyces tempisqueensis* [250], tendo-se verificado este efeito em culturas líquidas de *S. aureus* e *B. anthracis* [251].

A adesão bacteriana é importante para a colonização de tecidos durante a infecção [252] mas está dependente das propriedades da superfície da célula bacteriana como os pilis de adesão, estruturas que medeiam as ligações entre células bacterianas e entre estas e o hospedeiro [253]. Estes são uma característica comum a vários patógenos bacterianos como *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* [242].

Um grupo de pilicidas foram avaliadas contra *E. coli* uropatogénica tendo-se verificado uma redução de aproximadamente 90% da aderência das células à bexiga e da formação de biofilme nos isolados laboratoriais e clínicos [254].

Apesar das terapias anti virulência serem uma alternativa promissora ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, ainda existem algumas questões que devem ser tidas em conta. O facto de os fatores de virulência serem específicos de certos patógenos e a sua expressão estar dependente de fatores como as condições do meio envolvente, do local da infecção ou do tempo da infecção são alguns dos desafios que devem ser avaliados e ultrapassados para que esta terapia chegue ao uso clínico [255].

### 8.3 Anticorpos Antibacterianos

Apesar deste tipo de terapia ser muito utilizado para o tratamento de patologias do foro oncológico e reumático, o seu potencial para o tratamento de doenças infecciosas ainda não foi totalmente examinado [256]. Prevê-se que este tipo de terapia seja eficiente no combate contra os diversos fatores de virulência bacterianos e na combinação de diferentes modos de ação [257].

Por exemplo, foi verificado que anticorpos monoclonais contra a proteína A de *S. aureus* têm um efeito promissor no desenvolvimento de sépsis e peritonite em ratos [258].

Foi também verificada a ação protetora de anticorpos anti capsulares em infecções causadas por estirpes bastante virulentas e resistentes a carbapenemos de *K. pneumoniae*. Estes anticorpos mostraram-se eficazes na eliminação das bactérias através de processos extra e intracelulares e na prevenção da propagação da infecção dos pulmões para outros órgãos distais em ratos [259].

O potencial desta terapia mostra-se bastante encorajador, no entanto, é necessário mais trabalho e investimento para que estas descobertas científicas possam ser utilizadas clinicamente [126].

### 8.4 Desafios e Perspetivas Futuras

Os principais desafios encontrados na descoberta de novos antibióticos são principalmente financeiros que se complicam principalmente devido a obstáculos científicos e regulamentares [260,261]. Também a incerteza associada a este ramo científico resultou com que uma grande

parte das farmacêuticas tenha abandonado os seus programas de desenvolvimento de antibióticos [262], tendo-se verificado que, desde 1980, mais de 25 empresas farmacêuticas o fizeram e que atualmente muito poucas apresentam equipas de investigação dedicadas a esta área [263].

Este abandono por parte da indústria fez com que a pressão para a investigação e desenvolvimento de novas terapias caísse sobre grupos de investigação académicos e pequenas empresas que muitas vezes não têm a capacidade de liderar programas de investigação ou de suportar o seu impacto financeiro [261,264,265].

A verdade é que ainda muito está por ser investigado, por isso é necessário focar a nossa atenção na descoberta de novos alvos de ação, de novas classes de antibióticos e terapias alternativas para que possamos caminhar com sucesso para uma era pós antibiótica.

# **Bibliografia**

1. Ministério da Saúde. Manual de Boas Práticas Laboratoriais - Despacho nº 8835/2001. Diário da República - II série. 2001;(98):7383–96.
2. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Feb 26];72(1):32–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29164507/>
3. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [Internet]. 2015 Mar 13 [cited 2022 Sep 4];72:4–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25908411/>
4. Hornbeck P V. Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2023 Feb 26];2015(1):2.1.1-2.1.23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471142735.im0201s110>
5. Khatkhatay MI, Desai M. A comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to  $\beta$ -lactamase. *J Immunoassay* [Internet]. 1999 [cited 2023 Feb 26];20(3):151–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10458640/>
6. What is an ELISA & Types of ELISAs: R&D Systems [Internet]. [cited 2023 Feb 27]. Available from: <https://www.rndsystems.com/resources/what-is-an-elisa-and-elisa-types>
7. O’Kennedy R, Byrne M, O’Fagain C, Berns G. Experimental section. A Review of Enzyme-Immunoassay and a Description of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Immunoglobulin Concentrations. *Biochem Educ*. 1990 Jul 1;18(3):136–40.
8. Crowther J. The ELISA Guidebook Series Editor [Internet]. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cited 2023 Feb 26]. 9–16 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 516). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-254-4>
9. LINDSTRÖM P, WAGER O. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. *Scand J Immunol* [Internet]. 1978 [cited 2023 Feb 27];7(5):419–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/351795/>
10. Kitabchi AE. Proinsulin and C-peptide: a review. *Metabolism* [Internet]. 1977 [cited 2023 Mar 25];26(5):547–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/403392/>
11. Linde S, Røder ME, Hartling SG, Binder C, Welinder BS. Separation and quantitation of serum proinsulin and proinsulin intermediates in humans. *J Chromatogr* [Internet]. 1991 Jul 12 [cited 2023 Mar 25];548(1–2):371–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1939435/>
12. Robbins DC, Tager HS, Rubenstein AH. Biologic and Clinical Importance of Proinsulin. *N Engl J Med* [Internet]. 1984 Jan 13 [cited 2023 Mar 25];310(18):1165–75. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM198405033101807>
13. Pfützner A, Forst T. Elevated intact proinsulin levels are indicative of beta-cell dysfunction, insulin resistance, and cardiovascular risk: Impact of the antidiabetic agent pioglitazone. *J Diabetes Sci Technol* [Internet]. 2011 [cited 2023 Mar 25];5(3):784–93. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3192645/>
14. Houssa P, Dinesen B, Deberg M, Frank BH, Van Schravendijk C, Sodoyez-Goffaux F, et al. First direct assay for intact human proinsulin. *Clin Chem* [Internet]. 1998 Jul 1 [cited 2023 Mar 25];44(7):1514–9. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/44/7/1514/5642785>

15. Branche AR, Falsey AR. Parainfluenza Virus Infection. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Mar 27];37(4):538–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27486735/>
16. Mao N, Ji Y, Xie Z, Wang H, Wang H, An J, et al. Human Parainfluenza Virus-Associated Respiratory Tract Infection among Children and Genetic Analysis of HPIV-3 Strains in Beijing, China. *PLoS One* [Internet]. 2012 Aug 28 [cited 2023 Mar 28];7(8). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043893>
17. Gravina AG, Zagari RM, De Musis C, Romano L, Loguercio C, Romano M. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases: A review [Internet]. Vol. 24, *World Journal of Gastroenterology*. *World J Gastroenterol*; 2018 [cited 2023 Mar 29]. p. 3204–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30090002/>
18. FitzGerald R, Smith SM. An Overview of *Helicobacter pylori* Infection. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. *Methods Mol Biol*; 2021 [cited 2023 Mar 29]. p. 1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33765303/>
19. EUROIMMUN. Immunoblot [Internet]. [cited 2023 Feb 28]. Available from: <https://www.euroimmun.com/products/techniques/immunoblot/>
20. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim* 2015 11 [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Apr 11];1(1):1–22. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp201535>
21. Yilmaz G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. *J Clin Virol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Apr 10];21(3):187–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11397655/>
22. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, Terrault N, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Prim* 2017 31 [Internet]. 2017 Mar 2 [cited 2023 Apr 16];3(1):1–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp20176>
23. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2023 Apr 16];369:87–112. Available from: <https://www.hal.inserm.fr/inserm-00850902>
24. Alhabbab RY. Precipitation and Agglutination Reactions. In Springer, Cham; 2018 [cited 2023 Mar 3]. p. 23–30. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-77694-1\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-77694-1_3)
25. Mak TW, Saunders ME. The immune response: Basic and clinical principles [Internet]. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*. Elsevier; 2005 [cited 2023 Mar 5]. p. 1–1194. Available from: <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780120884513/the-immune-response>
26. Coico R, Sunshine G. *Immunology: A Short Course*. 7th ed. John Wiley & Sons Ltd; 2015.
27. Satyaputra F, Hendry S, Braddick M, Sivabalan P, Norton R. The Laboratory Diagnosis of Syphilis. *J Clin Microbiol*. 2021 Sep 20;59(10):e0010021.
28. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS. Primer: Syphilis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017 Oct 12 [cited 2023 Mar 8];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29022569/>
29. Ortiz DA, Shukla MR, Loeffelholz MJ. The Traditional or Reverse Algorithm for Diagnosis of Syphilis: Pros and Cons. *Clin Infect Dis*. 2020 Jun 24;71:S43–51.

30. Soreng K, Levy R, Fakile Y. Serologic testing for syphilis: Benefits and challenges of a reverse algorithm. *Clin Microbiol Newsl* [Internet]. 2014 Dec 12 [cited 2023 Mar 8];36(24):195–202. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5568569/>
31. Olopoenia LA, King AL. Widal agglutination test - 100 years later: still plagued by controversy. *Postgrad Med J* [Internet]. 2000 Feb [cited 2023 Mar 8];76(892):80–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10644383/>
32. Bula-Rudas FJ, Rathore MH, Maraga NF. Salmonella Infections in Childhood [Internet]. Vol. 62, *Advances in Pediatrics*. Adv Pediatr; 2015 [cited 2023 Mar 9]. p. 29–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26205108/>
33. Bhengsri S, Baggett HC, Edouard S, Dowell SF, Dasch GA, Fisk TL, et al. Sennetsu Neorickettsiosis, Spotted Fever Group, and Typhus Group Rickettsioses in Three Provinces in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Jul 7 [cited 2023 Mar 30];95(1):43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4944706/>
34. Amano KI, Hatakeyama H, Okuta M, Suto T, Mahara F. Serological studies of antigenic similarity between Japanese spotted fever rickettsiae and Weil-Felix test antigens. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1992 [cited 2023 Mar 30];30(9):2441–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265520/>
35. Brzica H, Breljak D, Burckhardt BC, Burckhardt G, Sabolić I. Oxalate: from the environment to kidney stones. *Arh Hig Rada Toksikol* [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 10];64(4):609–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384768/>
36. Eberts TJ, Sample RHB, Glick MR, Ellis GH. A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. *Clin Chem* [Internet]. 1979 Aug 1 [cited 2023 Mar 12];25(8):1440–3. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/25/8/1440/5671417>
37. Craig RM, Atkinson AJ. D-xylose testing: a review. *Gastroenterology* [Internet]. 1988 [cited 2023 Mar 12];95(1):223–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3286361/>
38. Elabscience. D-Xylose Colorimetric Assay Kit [Internet]. [cited 2023 Mar 13]. Available from: [https://www.elabscience.com/p-d\\_xylose\\_colorimetric\\_assay\\_kit-40318.html](https://www.elabscience.com/p-d_xylose_colorimetric_assay_kit-40318.html)
39. Luzzatto L, Ally M, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* [Internet]. 2020 Sep 10 [cited 2023 Mar 14];136(11):1225–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32702756/>
40. Trinity Biotech. G-6-PDH Quantitative kit - 50 Assays [Internet]. [cited 2023 Mar 14]. Available from: <https://www.trinitybiotech.com/products/g-6-pdh-kit-50-assays/>
41. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update [Internet]. Vol. 278, *Journal of Internal Medicine*. J Intern Med; 2015 [cited 2023 Mar 15]. p. 369–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26212387/>
42. EUROIMMUN. Indirect immunofluorescence tests (IIFT) from EUROIMMUN [Internet]. [cited 2023 Mar 14]. Available from: <https://www.euroimmun.com/products/techniques/ifa/>
43. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2018 Jun 6 [cited 2023 Mar 16];391(10138):2449. Available from: [/pmc/articles/PMC6661119/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6661119/)

44. Saúde DGG da. Norma nº 002/2011 Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus [Internet]. [cited 2023 Mar 20]. Available from: <https://normas.dgs.min-saude.pt/2011/01/14/diagnostico-e-classificacao-da-diabetes-mellitus/>
45. Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, Fritzler MJ, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Mar 20];78(7):879–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30862649/>
46. Ling M, Murali M. Antinuclear Antibody Tests [Internet]. Vol. 39, *Clinics in Laboratory Medicine. Clin Lab Med*; 2019 [cited 2023 Mar 20]. p. 513–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31668266/>
47. Ricciuto A, Griffiths AM. Clinical value of fecal calprotectin [Internet]. Vol. 56, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. Crit Rev Clin Lab Sci*; 2019 [cited 2023 Mar 22]. p. 307–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31088326/>
48. Ayling RM, Kok K. Fecal Calprotectin. *Adv Clin Chem* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Mar 22];87:161–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30342711/>
49. Thermo Fisher Scientific. EliA Stool Extraction Kit 2. 2021 Jul [cited 2023 Mar 24]; Available from: <https://dfu.phadia.com>
50. Thermo Fisher Scientific. EliA™ Calprotectin 2. 2021 Jul [cited 2023 Mar 24]; Available from: <https://dfu.phadia.com>
51. De Zorzi P de M, Kussler AP de S, Pimentel AM, Capp E, Corleta H von E. Semen Analysis of Total Motile Sperm Count Based on the 1999 and 2010 WHO Criteria. *J Bras Reprod Assist* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 1];26(2):261–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34786905/>
52. Centola GM, Blanchard A, Demick J, Li S, Eisenberg ML. Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: observations from a U.S. sperm bank. *Andrology* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Apr 1];4(2):270–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26789272/>
53. Vaughan DA, Sakkas D, Gardner DK. Sperm selection methods in the 21st century. *Biol Reprod* [Internet]. 2019 Dec 24 [cited 2023 Apr 1];101(6):1076–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30801632/>
54. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Nov 8 [cited 2023 Apr 6];345(19):1388–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11794171/>
55. World Health Organization. Infertility [Internet]. 2023 [cited 2023 Apr 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
56. World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2010 [cited 2023 Apr 5]. p. 286. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343208>
57. MICROPTIC S.L. SCA® Motility and concentration [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 5]. Available from: <https://www.micropticsl.com/products/sperm-class-analyzer-casa-system/main-modules/sca-motility-concentration/#>
58. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: A prospective study with healthy couples. *J Androl* [Internet]. 2000 Jan 2 [cited 2023 Jun

- 14];21(1):145–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03284.x>
59. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NHI, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod* [Internet]. 2000 [cited 2023 Jun 14];15(7):1562–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10875866/>
60. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Apr 4];169:56–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26919909/>
61. Esteves SC, Zini A, Coward RM, Evenson DP, Gosálvez J, Lewis SEM, et al. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Apr 8];53(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33108829/>
62. Halotech DNA. Halosperm® [Internet]. [cited 2023 Apr 9]. Available from: <https://www.halotechdna.com/productos/halosperm>
63. Ltd. RDI. Cobas® 8000 modular analyzer series [Internet]. [cited 2023 Apr 25]. Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas-8000-analyzer-series-sys-128.html>
64. Ltd. RDI. Cobas® 8000 ISE module [Internet]. [cited 2023 Apr 21]. Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-8000-ise-module-ins-2134.html>
65. Rifai N. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 6th ed. Rifai Nader, Horvath Andrea Rita, Wittier Carl T., editors. Elsevier, Inc.; 2018. 1867 p.
66. Oracio H, Drogué JA, Adias EM. Hyponatremia. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005183422006> [Internet]. 2000 May 18 [cited 2023 May 2];342(20):1493–9. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200005183422006>
67. Marco Martínez J. Hyponatremia: Classification and differential diagnosis. *Endocrinol y Nutr* [Internet]. 2010 [cited 2023 May 2];57(SUPPL. 2):2–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21130956/>
68. Gumz ML, Rabinowitz L, Wingo CS. An Integrated View of Potassium Homeostasis. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jul 7 [cited 2023 May 1];373(1):60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5675534/>
69. Palmer BF, Clegg DJ. Diagnosis and treatment of hyperkalemia. *Cleve Clin J Med* [Internet]. 2017 [cited 2023 May 1];84(12):934–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29244647/>
70. Mandal AK. Hypokalemia and hyperkalemia. *Med Clin North Am* [Internet]. 1997 [cited 2023 May 1];81(3):611–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9167648/>
71. Berend K, Van Hulsteijn LH, Gans ROB. Chloride: the queen of electrolytes? *Eur J Intern Med* [Internet]. 2012 [cited 2023 May 1];23(3):203–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22385875/>
72. Sumien N, Shetty RA, Gonzales EB. Creatine, creatine kinase, and aging. *Subcell Biochem* [Internet]. 2018 [cited 2023 May 2];90:145–68. Available from:

- [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-2835-0\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-2835-0_6)
73. Ltd. RDI. AST cobas c 701/702 [Internet]. 2022 [cited 2023 May 10]. Available from: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/411f6ab4-924f-ed11-1891-005056a71a5d?countryIsoCode=pi>
  74. Ltd. RDI. ALT cobas c 701/702 [Internet]. 2022. Available from: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/1fdb7983-8e4f-ed11-1891-005056a71a5d?countryIsoCode=pi>
  75. Åkerström B, Lögdberg L, Berggård T, Osmark P, Lindqvist A. alpha(1)-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2000 Oct 18 [cited 2023 May 4];1482(1–2):172–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11058759/>
  76. Penders J, Delanghe JR. Alpha 1-microglobulin: Clinical laboratory aspects and applications. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2004 Aug 16 [cited 2023 May 4];346(2):107–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15256311/>
  77. Ltd. RDI. A1MGU ccobas c 701/702 [Internet]. 2020 [cited 2023 May 4]. Available from: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/be53d1f6-f533-eb11-0091-005056a772fd?countryIsoCode=pi>
  78. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010 Jul;20(4):202–13.
  79. Johnson J, Anderson B, Pass RF. Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55(2):521–30.
  80. Centers for Disease Control and Prevention. About Cytomegalovirus and Congenital CMV Infection [Internet]. 2020 [cited 2023 May 5]. Available from: <https://www.cdc.gov/cmV/overview.html>
  81. Plosa EJ, Esbenshade JC, Fuller MP, Weitkamp JH. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev*. 2012;33(4):156–63.
  82. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2023 May 6];22(5):347–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20410258/>
  83. Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med*. 2005;33:10–2.
  84. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Interleukin-6 in Surgery, Trauma, and Critical Care Part II: Clinical Implications. *J Intensive Care Med* [Internet]. 2011 Mar [cited 2023 May 6];26(2):73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223019/>
  85. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2006 Jul [cited 2023 May 6];8 Suppl 2(Suppl 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16899107/>
  86. Qiong L, Yin J. Characterization of alpha-1-acid glycoprotein as a potential biomarker for breast cancer. *Bioengineered* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 7];13(3):5818. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8973993/>
  87. Putnam FW. The plasma proteins : structure, function, and genetic control [Internet]. Academic Press; 1975 [cited 2023 May 7]. Available from: <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780125684019/the-plasma-proteins>
  88. Ltd. RDI. AAGP2 cobas c 501/502 [Internet]. 2021 [cited 2023 May 7]. Available from:

- <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/15690807-b63c-ec11-0b91-005056a772fd?countryIsoCode=pi>
89. Szczerba A, Białas P, Pięta PP, Jankowska A. hCG – related molecules and their measurement. *Ginekol Pol* [Internet]. 2016 [cited 2023 May 8];87(1):65–70. Available from: [https://journals.viamedica.pl/ginekologia\\_polska/article/view/45623](https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/45623)
  90. Ziolkowska K, Dydowicz P, Sobkowski M, Tobola-Wrobel K, Wysocka E, Pietryga M. The clinical usefulness of biochemical (free  $\beta$ -hCg, PaPP-a) and ultrasound (nuchal translucency) parameters in prenatal screening of trisomy 21 in the first trimester of pregnancy. *Ginekol Pol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 May 8];90(3):161–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30950006/>
  91. Nicolaidis KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* [Internet]. 2011 Jan [cited 2023 May 8];31(1):7–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21210475/>
  92. Echeverry G, Hortin GL, Rai AJ. Introduction to urinalysis: historical perspectives and clinical application [Internet]. Vol. 641, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Methods Mol Biol; 2010 [cited 2023 May 9]. p. 1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20407938/>
  93. Ltd. RDI. Cobas u pack [Internet]. 2021 [cited 2023 May 9]. Available from: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/0f870ec6-ad2a-ec11-0d91-005056a71a5d?countryIsoCode=us>
  94. Kelley DE, Schnobrich MR, Gayer S, Scoggin C, Bradcamp E, Canisso IF. Leukocyte Esterase Reagent Strips for Stall-Side Diagnosis of Endometritis in Mares. *J equine Vet Sci* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 May 9];81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31668301/>
  95. Turgeon ML. *Clinical hematology: theory and procedures*. 2012;612.
  96. National Health Service. Red blood Cell count [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 14]. Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/red-blood-count/>
  97. Peter Klinken S. Red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Dec 1;34(12):1513–8.
  98. SE. SE. DC sheath flow detection method [Internet]. [cited 2023 Jun 25]. Available from: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/technologies/dc-sheath-flow-detection-method.html>
  99. SE. SE. *The red blood cell indices*. 2012;
  100. Celkan TT. What does a hemogram say to us? *Turk Pediatr Ars* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 16];55(2):103–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32684755/>
  101. SYSMEX PORTUGAL SA. XN-1000 analyzer [Internet]. [cited 2023 May 17]. Available from: <https://www.sysmex.es/es-pt/productos/products-detail/xn-1000.html>
  102. Lee ACW. Haematologist-reviewed peripheral blood smear in paediatric practice. *Singapore Med J* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 May 18];59(2):64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6119740/>
  103. SE. SE. DI-60 analyzer [Internet]. 2023 [cited 2023 May 18]. Available from: <https://www.sysmex.es/es-pt/productos/products-detail/di-60.html>
  104. Harrison M. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein. *Aust Prescr* [Internet]. 2015 Jun 27 [cited 2023 May 19];38(3):93–4. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26648629/>
105. K T, V G. Erythrocyte Sedimentation Rate. *Lab Hematol Pract* [Internet]. 2023 Aug 8 [cited 2023 May 21];638–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491417/>
  106. Jaisson S, Leroy N, Soulard M, Desmons A, Guillard E, Gillery P. Evaluation of the analytical performances of the Cobas c513 analyser for HbA1c assay. *Biochem Medica* [Internet]. 2018 Oct 10 [cited 2023 May 21];28(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6214704/>
  107. Gifford JL, Higgins T, Sadrzadeh SMH. A high-throughput test for diabetes care: An evaluation of the next generation Roche Cobas c 513 hemoglobin A1C assay. *Pract Lab Med*. 2019 Nov 1;17:e00147.
  108. Ltd. RDI. HbA1c c513. 2019;
  109. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* [Internet]. 2008 [cited 2023 May 25];55(3–4):174–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18797129/>
  110. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* [Internet]. 2000 Jan 15 [cited 2023 May 25];95(2):375–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10627438/>
  111. Gasbarrini A, Corazza GR, Gasbarrini G, Montalto M, Di Stefano M, Basilisco G, et al. Methodology and indications of H<sub>2</sub>-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 [cited 2023 May 30];29 Suppl 1(SUPPL. 1):1–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19344474/>
  112. De Geyter C, Van de Maele K, Hauser B, Vandenplas Y. Hydrogen and Methane Breath Test in the Diagnosis of Lactose Intolerance. *Nutrients* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 May 30];13(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34579138/>
  113. Catanzaro R, Sciuto M, Marotta F. Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Nutr Res* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 30];89:23–34. Available from: [www.sciencedirect.com/journalhomepage:www.elsevier.com/locate/NTR](http://www.sciencedirect.com/journalhomepage:www.elsevier.com/locate/NTR)
  114. Kasidas GP, Samuell CT, Weir TB. Renal stone analysis: why and how? *Ann Clin Biochem* [Internet]. 2004 Mar [cited 2023 May 31];41(Pt 2):91–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15025798/>
  115. Phillips JD. Heme biosynthesis and the porphyrias. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2023 Jun 4];128(3):164. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7252266/>
  116. Di Pierro E, De Canio M, Mercadante R, Savino M, Granata F, Tavazzi D, et al. Laboratory Diagnosis of Porphyria. *Diagnostics* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Jun 4];11(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8391404/>
  117. Benton CM, Lim CK, Ritchie HJ, Moniz C, Jones DJL. Ultra high-performance liquid chromatography of porphyrins. *Biomed Chromatogr*. 2012;26(3):331–7.
  118. Blum F. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med (Lond)* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jun 4];75(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24521830/>
  119. Scheiber I, Dringen R, Mercer JFB. Copper: effects of deficiency and overload. *Met Ions*

- Life Sci [Internet]. 2013 [cited 2023 Jun 2];13:359–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24470097/>
120. Spector H, Glusman S, Jatlow P, Seligson D. Direct determination of copper in urine by atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chim Acta*. 1971 Jan 1;31(1):5–11.
  121. Holcombe JA, Borges DLG. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Encycl Anal Chem*. 2010;
  122. Waksman SA. What is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*. 1947;39(5):565–9.
  123. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Use Questions and Answers [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 17]. Available from: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/q-a.html>
  124. Nicolaou KC, Rigol S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Mar 20];71(2):153–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28676714/>
  125. Mohr K. History of Antibiotics Research. 2016;37(October):435. Available from: [http://books.google.com/books?id=\\_DDwCqx6wpcC&printsec=frontcover&dq=unwritten+rules+of+phd+research&hl=&cd=1&source=gbs\\_api%255Cnpapers2://publication/uuid/48967E01-55F9-4397-B941-310D9C5405FA%255Cnhttp://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243](http://books.google.com/books?id=_DDwCqx6wpcC&printsec=frontcover&dq=unwritten+rules+of+phd+research&hl=&cd=1&source=gbs_api%255Cnpapers2://publication/uuid/48967E01-55F9-4397-B941-310D9C5405FA%255Cnhttp://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243)  
N.p
  126. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics : past , present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019;51(Figure 1):72–80.
  127. Kitchin JES, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K, Shupack JL. Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1997 [cited 2023 Jan 20];37(3 Pt 1):445–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9308561/>
  128. Bentley R. Mycophenolic acid: A one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem Rev* [Internet]. 2000 Oct [cited 2023 Jan 20];100(10):3801–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11749328/>
  129. Khardori N, Stevaux C, Ripley K. Antibiotics: From the Beginning to the Future: Part 1. Vol. 87, *Indian Journal of Pediatrics*. Springer; 2020. p. 39–42.
  130. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin’s Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *YALE J Biol Med*. 2017;90:135–45.
  131. Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? [Internet]. Vol. 163, *British Journal of Pharmacology*. Wiley-Blackwell; 2011 [cited 2022 Mar 27]. p. 184–94. Available from: </pmc/articles/PMC3085877/>
  132. Gallagher JC, MacDougall C. Antibiotics Simplified 4 edition [Internet]. *Drug Dosing in Obesity: Volume I: Antimicrobials*. Jones & Bartlett Learning; 2018. 86; Available from: [www.jblearning.com](http://www.jblearning.com).
  133. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 Sep 19];6(8). Available from: </pmc/articles/PMC4968164/>
  134. Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm* [Internet]. 2019 Oct 10 [cited 2022 Sep 20];10(10):1719. Available from: </pmc/articles/PMC6836748/>

135. Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2022 Sep 20];41 Suppl 2(2 SUPPL.). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15942877/>
136. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* [Internet]. 2014 Mar 18 [cited 2022 Sep 20];53(10):1565–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24576155/>
137. Begg EJ, Barclay ML. Aminoglycosides--50 years on. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 1995 Jun [cited 2022 Sep 20];39(6):597. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1365070/>
138. Böttger EC, Crich D. Aminoglycosides: Time for Resurrection of a Neglected Class of Antibacterials? *ACS Infect Dis* [Internet]. 2020 Feb 2 [cited 2022 Sep 20];6(2):168. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7024022/>
139. Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1989 Nov [cited 2022 Sep 20];8(11):943–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2532132/>
140. Zeng D, Debabov D, Hartsell TL, Cano RJ, Adams S, Schuyler JA, et al. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2016 [cited 2022 Sep 20];6(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5131748/>
141. Lenz KD, Klosterman KE, Mukundan H, Kubicek-Sutherland JZ. Macrolides: From Toxins to Therapeutics. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Sep 20];13(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34065929/>
142. Dinos GP. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Sep 20];174(18):2967–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28664582/>
143. Vázquez-Laslop N, Mankin AS. How Macrolide Antibiotics Work [Internet]. Vol. 43, *Trends in Biochemical Sciences*. NIH Public Access; 2018 [cited 2022 Sep 20]. p. 668–84. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6108949/>
144. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. 2001; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99026/>
145. LaPlante KL, Dhand A, Wright K, Lauterio M. Re-establishing the utility of tetracycline-class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance. *Ann Med* [Internet]. 2022;54(1):1686–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35723082/>
146. Shaw KJ, Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. 2011;48–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22191526/>
147. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, et al. Phosphonomycin, a New Antibiotic Produced by Strains of *Streptomyces*. *Science* (80-) [Internet]. 1969 Oct 3 [cited 2022 Sep 21];166(3901):122–3. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.166.3901.122>
148. Fosfomycin. 2016; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786888/>
149. Centers for Disease Control and Prevention. About Antimicrobial Resistance [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 15]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>

150. Abushaheen MA, Muzaaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis Mon* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Sep 19];66(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32201008/>
151. Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria [Internet]. Vol. 47, *Medicina*. Medicina (Kaunas); 2011 [cited 2022 Mar 27]. p. 137–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822035/>
152. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. 2021 [cited 2023 Jun 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
153. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance [Internet]. Vol. 317, *British Medical Journal*. BMJ Publishing Group; 1998 [cited 2022 Sep 23]. p. 657–60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1113838/>
154. McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm* [Internet]. 1997 Jun 15 [cited 2022 Sep 23];54(12):1420–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9194989/>
155. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol*. 2008;46(1):11–21.
156. Piddock LJV, Wise R. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1987 May 1 [cited 2022 Sep 23];41(3):289–94. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/41/3/289/507825>
157. McInnes RS, McCallum GE, Lamberte LE, van Schaik W. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Sep 23];53:35–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143027/>
158. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2005 Jul 29 [cited 2022 Sep 22];57(10):1451–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15950313/>
159. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2001 [cited 2022 Sep 23];14(4):933–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11585791/>
160. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2010 [cited 2022 Sep 23];13(6):151–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2992599/>
161. Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol* [Internet]. 1994 [cited 2022 Sep 24];2(10):361–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7850202/>
162. de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power [Internet]. Vol. 10, *Current Opinion in Microbiology*. NIH Public Access; 2007 [cited 2022 Sep 24]. p. 428–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701899/>
163. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat*

- Rev Microbiol [Internet]. 2014 Jan [cited 2022 Sep 24];12(1):35–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24336183/>
164. Bush NG, Diez-Santos I, Abbott LR, Maxwell A. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Sep 24];25(23). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33271787/>
  165. Zgurskaya HI. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Sep 24];292(2):95–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12195740/>
  166. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2009 May [cited 2022 Sep 24];1794(5):808–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19100346/>
  167. Lowy FD. Staphylococcus aureus Infections. *N Engl J Med* [Internet]. 1998 Aug 20 [cited 2022 Sep 26];339(8):520–32. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199808203390806>
  168. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 2019 174 [Internet]. 2019 Feb 8 [cited 2022 Sep 25];17(4):203–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0147-4>
  169. Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG. Staphylococci in Human Disease [Internet]. Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG, editors. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781444308464>
  170. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Jul;10(3):505–20.
  171. Boucher H, Miller LG, Razonable RR. Serious Infections Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 15;51(S2):S183–97.
  172. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019;17(4):203–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
  173. Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S.  $\beta$ -Lactam resistance in Staphylococcus aureus: The adaptive resistance of a plastic genome. Vol. 62, Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. p. 2617–33.
  174. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology [Internet]. Vol. 31, Clinical microbiology reviews. American Society for Microbiology (ASM); 2018 [cited 2022 Sep 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6148192/>
  175. Shang Wei Wu, De Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the mecA gene homologue of Staphylococcus sciuri into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* [Internet]. 2001 [cited 2022 Sep 28];183(8):2417–24. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.183.8.2417-2424.2001>
  176. De Lencastre H, Wu SW, Pinho MG, Ludovice AM, Filipe S, Gardete S, et al. Antibiotic resistance as a stress response: Complete sequencing of a large number of chromosomal loci in Staphylococcus aureus strain COL that impact on the expression of resistance to

- methicillin. *Microb Drug Resist.* 1999;5(3):163–75.
177. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim* 2018 41 [Internet]. 2018 May 31 [cited 2022 Sep 25];4(1):1–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp201833>
  178. OneHealthTrust. Antibiotic Resistance [Internet]. [cited 2023 Jan 19]. Available from: <https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>
  179. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus* [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Microbiology*. NIH Public Access; 2014 [cited 2022 Sep 27]. p. 49–62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708296/>
  180. Otto M. Staphylococcal biofilms. Vol. 322, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2008. p. 207–28.
  181. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas D. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation [Internet]. Vol. 19, *Trends in Microbiology*. NIH Public Access; 2011 [cited 2022 Sep 27]. p. 225–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3087859/>
  182. Spaan AN, Surewaard BGJ, Nijland R, Van Strijp JAG. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2022 Sep 27];67:629–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23834243/>
  183. McCullough AR, Parekh S, Rathbone J, Del Mar CB, Hoffmann TC. A systematic review of the public’s knowledge and beliefs about antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Oct 12];71(1):27–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26459555/>
  184. David JC, Piednoir E, Delouvé S. Knowledge and perceptions of antibiotic resistance in the French population. *Infect Dis now* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2022 Oct 11];52(5):306–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35331974/>
  185. European Commission. Antimicrobial Resistance Survey [Internet]. 2018 [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://europa.eu/eurobarometer/surveys/detail/2190>
  186. Grigoryan L, Haaijer-Ruskamp FM, Burgerhof JGM, Mechtler R, Deschepper R, Tambic-Andrasevic A, et al. Self-medication with antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2006 [cited 2022 Oct 12];12(3):452–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16704784/>
  187. McNulty CAM, Boyle P, Nichols T, Clappison DP, Davey P. Antimicrobial drugs in the home, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2006 [cited 2022 Oct 12];12(10):1523–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17176566/>
  188. Teixeira Rodrigues A, Roque F, Falcão A, Figueiras A, Herdeiro MT. Understanding physician antibiotic prescribing behaviour: a systematic review of qualitative studies. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2013 [cited 2022 Oct 12];41(3):203–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23127482/>
  189. Gonzalez-Gonzalez C, López-Vázquez P, Vázquez-Lago JM, Piñeiro-Lamas M, Herdeiro MT, Arzamendi PC, et al. Effect of Physicians’ Attitudes and Knowledge on the Quality of Antibiotic Prescription: A Cohort Study. *PLoS One* [Internet]. 2015 Oct 28 [cited 2022 Oct 12];10(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26509966/>

190. McCullough AR, Rathbone J, Parekh S, Hoffmann TC, Del Mar CB. Not in my backyard: a systematic review of clinicians' knowledge and beliefs about antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Oct 12];70(9):2465–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26093375/>
191. van der Voort T, Brinkman DJ, Benemei S, Böttiger Y, Chamontin B, Christiaens T, et al. Appropriate antibiotic prescribing among final-year medical students in Europe. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Oct 13];54(3):375–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31075400/>
192. Dyar OJ, Nathwani D, Monnet DL, Gyssens IC, Lundborg CS, Pulcini C. Do medical students feel prepared to prescribe antibiotics responsibly? Results from a cross-sectional survey in 29 European countries. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2018;73(8):2236–42. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/73/8/2236/4994358>
193. Spurling GK, Mansfield PR, Montgomery BD, Lexchin J, Doust J, Othman N, et al. Information from pharmaceutical companies and the quality, quantity, and cost of physicians' prescribing: a systematic review. *PLoS Med* [Internet]. 2010 Oct [cited 2022 Oct 13];7(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20976098/>
194. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2008 Feb [cited 2022 Oct 14];61(2):428–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18156278/>
195. Machowska A, Lundborg CS. Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Jun 21];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3338985/>
196. Di Cesare A, Eckert EM, D'Urso S, Bertoni R, Gillan DC, Wattiez R, et al. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Res*. 2016 May 1;94:208–14.
197. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2022 Oct 17];447:345–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23396083/>
198. Xiong W, Sun Y, Ding X, Wang M, Zeng Z. Selective pressure of antibiotics on ARGs and bacterial communities in manure-polluted freshwater-sediment microcosms. *Front Microbiol*. 2015;6(MAR):194.
199. Fernando DM, Tun HM, Poole J, Patidar R, Li R, Mi R, et al. Detection of antibiotic resistance genes in source and drinking water samples from a first nations community in Canada. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2016 Aug 8 [cited 2022 Oct 17];82(15):4767–75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4984272/>
200. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Oct 18];42(1):68–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29069382/>
201. Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011;7(7):1002158. Available from: [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org)

202. Sahoo KC, Tamhankar AJ, Johansson E, Lundborg CS. Antibiotic use, resistance development and environmental factors: A qualitative study among healthcare professionals in Orissa, India. *BMC Public Health* [Internet]. 2010 Oct 21 [cited 2022 Oct 18];10(1):1–10. Available from: <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-10-629>
203. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DGJ. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 2009;28(12):2522–7. Available from: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/09-073.1>
204. Marathe NP, Regina VR, Walujkar SA, Charan SS, Moore ERB, Larsson DGJ, et al. A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2022 Oct 18];8(10):e77310. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077310>
205. The State of the World's Antibiotics in 2021 - One Health Trust [Internet]. [cited 2022 Oct 19]. Available from: <https://onehealthtrust.org/publications/reports/the-state-of-the-worlds-antibiotic-in-2021/>
206. Gao P, Ding Y, Li H, Xagorarakis I. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere* [Internet]. 2012 [cited 2023 Jan 24];88(1):17–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22494528/>
207. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* [Internet]. 2006 Oct [cited 2022 Oct 18];65(5):725–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16677683/>
208. Berendsen BJA, Wegh RS, Memelink J, Zuidema T, Stolker LAM. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2022 Oct 18];132:258–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25476307/>
209. Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Jan 24];12(9):412–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15337162/>
210. Kunhikannan S, Thomas CJ, Franks AE, Mahadevaiah S, Kumar S, Petrovski S. Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *Microbiologyopen* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Sep 29];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34180594/>
211. Infante B, Grape M, Larsson M, Kristiansson C, Pallecchi L, Rossolini GM, et al. Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2005 [cited 2023 Jan 24];25(4):308–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15784310/>
212. Tule A, Hassani U. Colonization with Antibiotic-Resistant *E. coli* in Commensal Fecal Flora of Newborns. *IntJCurrMicrobiolAppSci* [Internet]. 2017 [cited 2023 Jan 24];6(5):1623–9. Available from: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.177>
213. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022 Feb 12;399(10325):629–55.
214. O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and

- Recommendations. 2016 [cited 2022 Nov 10]; Available from: <https://amr-review.org/>
215. Dadgostar P. Antimicrobial resistance: implications and costs [Internet]. Vol. 12, *Infection and Drug Resistance*. Dove Press; 2019 [cited 2022 Oct 27]. p. 3903–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6929930/>
  216. Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *Eur J Pharm Sci*. 2022 Mar 1;170.
  217. Ahmad M, Khan AU. Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Oct 21];19:313–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31176071/>
  218. Ghosh S, Bornman C, Zafer MM. Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand? *J Infect Public Health*. 2021 May 1;14(5):555–60.
  219. Getahun H, Smith I, Trivedi K, Paulin S, Balkhy HH. Tackling antimicrobial resistance in the COVID-19 pandemic. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Dec 28];98(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32742026/>
  220. CDC A. 2022 Special Report: COVID-19 U.S. Impact on Antimicrobial Resistance. *Centers Dis Control Prev* [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 23]; Available from: <https://dx.doi.org/10.15620/cdc:117915>
  221. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. COVID-19: Impact on prescribing and antimicrobial resistance. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Dec 23];34 Suppl 1(Suppl1):63–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34598431/>
  222. Vincent JL, Sakr Y, Singer M, Martin-Loeches I, MacHado FR, Marshall JC, et al. Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* [Internet]. 2020 Apr 21 [cited 2022 Dec 28];323(15):1478–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32207816/>
  223. Mahmoudi H. Bacterial co-infections and antibiotic resistance in patients with COVID-19. *GMS Hyg Infect Control* [Internet]. 2020 [cited 2022 Dec 23];15:Doc35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7747008/>
  224. Rawson TM, Moore LSP, Zhu N, Ranganathan N, Skolimowska K, Gilchrist M, et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Dec 28];71(9):2459–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32358954/>
  225. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance [Internet]. Vol. 78, *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*; 2014 [cited 2023 Jan 4]. p. 14–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25450262/>
  226. Iskandar K, Murugaiyan J, Halat DH, Hage S El, Chibabhai V, Adukkadukkam S, et al. Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiot (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Jan 8];11(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35203785/>
  227. Spellberg B, Srinivasan A, Chambers HF. New Societal Approaches to Empowering Antibiotic Stewardship. *JAMA* [Internet]. 2016 Mar 22 [cited 2023 Jan 8];315(12):1229–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26914942/>
  228. Wang CH, Hsieh YH, Powers ZM, Kao CY. Defeating antibiotic-resistant bacteria:

- Exploring alternative therapies for a post-antibiotic era [Internet]. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. *Int J Mol Sci*; 2020 [cited 2022 Sep 19]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32033477/>
229. Czaplowski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review [Internet]. Vol. 16, *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier; 2016 [cited 2023 Jan 10]. p. 239–51. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309915004661/fulltext>
230. Monk AB, Rees CD, Barrow P, Hagens S, Harper DR. Bacteriophage applications: where are we now? *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2023 Jan 12];51(4):363–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20796209/>
231. Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials [Internet]. Vol. 24, *Trends in Biotechnology*. *Trends Biotechnol*; 2006 [cited 2023 Jan 12]. p. 212–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16567009/>
232. Moghadam MT, Amirmozafari N, Shariati A, Hallajzadeh M, Mirkalantari S, Khoshbayan A, et al. How phages overcome the challenges of drug resistant bacteria in clinical infections. *Infect Drug Resist*. 2020;13:45–61.
233. Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Apr 4 [cited 2023 Jan 12];93(8):3188–92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC39580/>
234. Hua Y, Luo T, Yang Y, Dong D, Wang R, Wang Y, et al. Phage Therapy as a Promising New Treatment for Lung Infection Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Mice. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 9 [cited 2023 Jan 13];8(JAN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29375524/>
235. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonia I, Riggava S, et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Jan 13];21(3):427–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32949500/>
236. Cloeckert A, Chaidez C, Mai V, Dissanayake U, Ukhanova M, Moye ZD, et al. Bacteriophages Reduce Pathogenic *Escherichia coli* Counts in Mice Without Distorting Gut Microbiota. 2019 [cited 2023 Jan 14]; Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
237. Örmälä AM, Jalasvuori M. Phage therapy Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? 2013 [cited 2023 Jan 14]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kbac20>
238. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. *Pharm Res*. 2015;32:2173–9.
239. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens [Internet]. Vol. 5, *Virulence*. Taylor & Francis; 2014 [cited 2023 Jan 14]. p. 226–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916379/>
240. Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, Azeredo J. Revisiting phage therapy: New applications for old resources [Internet]. Vol. 23, *Trends in Microbiology*. *Trends Microbiol*; 2015 [cited 2023 Jan 14]. p. 185–91. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25708933/>
241. Diard M, Hardt WD. Evolution of bacterial virulence [Internet]. Vol. 41, FEMS Microbiology Reviews. 2017 [cited 2023 Jan 14]. p. 679–97. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/5/679/3844166>
  242. Mühlen S, Dersch P. Anti-virulence Strategies to Target Bacterial Infections. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Jan 14];398:147–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26942418/>
  243. Chandran V. Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2013 Feb [cited 2023 Jan 14];41(1):17–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23356253/>
  244. Yan J, Bassler BL. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2019 Jul 10 [cited 2023 Jan 14];26(1):15–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31295420/>
  245. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action [Internet]. Vol. 9, Virulence. Taylor & Francis; 2018 [cited 2023 Jan 14]. p. 522–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955472/>
  246. Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, et al. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2023 Jan 14];191(23):7333–42. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
  247. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Jan 14];15(12):740–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28944770/>
  248. Kramer J, Özkaya Ö, Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Jan 14];18(3):152–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31748738/>
  249. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2007 Sep [cited 2023 Jan 14];71(3):413–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17804665/>
  250. Wencewicz TA. New antibiotics from Nature’s chemical inventory. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2016 [cited 2023 Jan 14];24(24):6227–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27658795/>
  251. Madsen JLH, Johnstone TC, Nolan EM. Chemical Synthesis of Staphyloferrin B Affords Insight into the Molecular Structure, Iron Chelation, and Biological Activity of a Polycarboxylate Siderophore Deployed by the Human Pathogen *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2015 Jul 22 [cited 2023 Jan 14];137(28):9117–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26030732/>
  252. Słotwińska SM. Host and bacterial adhesion [Internet]. Vol. 16, Polish Journal of Veterinary Sciences. *Pol J Vet Sci*; 2013 [cited 2023 Jan 14]. p. 153–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23691591/>
  253. Epler Barbercheck CR, Bullitt E, Andersson M. Bacterial Adhesion Pili. *Subcell Biochem* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jan 14];87:1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29464555/>

254. Pinkner JS, Remaut H, Buelens F, Miller E, Åberg V, Pemberton N, et al. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Nov 21 [cited 2023 Jan 14];103(47):17897–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17098869/>
255. Theuretzbacher U, Piddock LJV. Non-traditional Antibacterial Therapeutic Options and Challenges. *Cell Host Microbe*. 2019 Jul 10;26(1):61–72.
256. McConnell MJ. Where are we with monoclonal antibodies for multidrug-resistant infections? *Drug Discov Today* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2023 Jan 16];24(5):1132–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30853568/>
257. Nagy E, Nagy G, Power CA, Badarau A, Szijártó V. Anti-bacterial Monoclonal Antibodies. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Jan 16];1053:119–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29549638/>
258. Yang Y, Qian M, Yi S, Liu S, Li B, Yu R, et al. Monoclonal antibody targeting staphylococcus aureus surface protein A (SasA) protect against staphylococcus aureus sepsis and peritonitis in mice. *PLoS One* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Jan 16];11(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4771200/>
259. Diago-Navarro E, Motley MP, Ruiz-Peréz G, Yu W, Austin J, Seco BMS, et al. Novel, broadly reactive anticapsular antibodies against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* protect from infection. *MBio* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Jan 16];9(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5885035/>
260. Boyd NK, Teng C, Frei CR. Brief Overview of Approaches and Challenges in New Antibiotic Development: A Focus On Drug Repurposing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 May 17;11:442.
261. Renwick M, Mossialos E. What are the economic barriers of antibiotic R&D and how can we overcome them? *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2018 Oct 3 [cited 2023 Jan 17];13(10):889–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30175625/>
262. Actis GC. The gut microbiome. *Inflamm Allergy - Drug Targets* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2023 Jan 17];13(4):217–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24953716/>
263. Foulston L. Genome mining and prospects for antibiotic discovery [Internet]. Vol. 51, *Current Opinion in Microbiology*. *Curr Opin Microbiol*; 2019 [cited 2023 Jan 17]. p. 1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30776510/>
264. Dutescu IA, Hillie SA. Encouraging the development of new antibiotics: Are financial incentives the right way forward? A systematic review and case study. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 17];14:415–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7872909/>
265. Brogan DM, Mossialos E. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. *Global Health* [Internet]. 2016 Mar 22 [cited 2023 Jan 17];12(1):1–7. Available from: <https://globalizationandhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12992-016-0147-y>