



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

António Eduardo Caires de Sousa

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Bárbara Rocha e pelo Doutor Nuno Canhoto, sendo apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

António Eduardo Caires de Sousa

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Bárbara Rocha e pelo Doutor Nuno Canhoto, sendo apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica
Hospital Dr. Nélio Mendonça, Funchal (Madeira)

Julho 2022

Agradecimentos

Termina assim uma jornada de dois anos, contudo não a percorri sozinho. A conclusão desta etapa só foi possível com muita dedicação, sacrifício, estudo e determinação. Deste modo, quero agradecer a todos aqueles que contribuíram, de alguma maneira, para que eu conseguisse chegar onde estou hoje e acima de tudo por me recordarem que nada se conquista sem esforço e que no fim a recompensa vale sempre a pena.

Assim, em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Bárbara Rocha, minha orientadora interna e coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por toda a atenção, disponibilidade e compreensão demonstrada ao longo do estágio, bem como pela ajuda na revisão e finalização do relatório.

Ao Doutor Nuno Canhoto, meu orientador externo e diretor do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, que fez de tudo para me proporcionar um estágio enriquecedor no laboratório e que, apesar das circunstâncias e da sua agenda ocupada, conseguiu arranjar tempo para organizar o meu estágio e ajudar na revisão do relatório.

Ao Dr. Ilídio Ornelas, responsável pela secção de Endocrinologia e Dra. Filipa Vicente, responsável pela secção de Microbiologia, pela forma como me integraram na rotina laboratorial, pela ajuda na revisão do relatório e por todos os conhecimentos, informação e conselhos que me transmitiram ao longo do estágio.

À Dra. Helena Rodrigues e Dra. Marlene Pires pela ajuda na colheita dos casos clínicos e pela sua disponibilidade na discussão dos mesmos.

A todos os técnicos do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, em especial à Dra. Dulce Silva, Dra. Sara Pereira, Dra. Liliana Cardoso, Dra. Fabiana Gonçalves, Dra. Isabel Freitas e Dra. Marisa Gonçalves, que estiveram do meu lado tanto nos momentos mais felizes quanto nos mais difíceis, motivando-me a continuar em frente e não desistir.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional, paciência, por serem incansáveis e fazerem tudo para que eu tenha as ferramentas certas para alcançar os meus objetivos pessoais e profissionais.

Aos meus amigos, em particular, ao José António e Steven Freitas pelos momentos de descontração e companheirismo ao longo dos anos de faculdade.

Às minhas amigas, em especial, à Inês Freitas e Madalena Anjo, pelos momentos de desabafo, pela motivação e por acreditarem sempre em mim.

À ala central do piso -2 da Residência Universitária do Pólo 3 por me acolher de forma calorosa e por ter sido o meu lar em Coimbra.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os meus professores e colegas do mestrado, pois inspiraram-me a procurar ser, saber, questionar e viver mais.

Índice

Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
Resumo	xix
Abstract.....	xix
1. Introdução.....	1
2. Caracterização do laboratório	1
3. Funções desempenhadas.....	2
3.1. Secção Microbiologia.....	2
3.2. Secção Hematologia	2
3.3. Secção Serologia e Biologia Molecular	3
3.4. Secção Endocrinologia	4
3.5. Secção Bioquímica.....	4
3.6. Secção Imunologia.....	4
4. Fase pré-analítica.....	5
5. Secção Microbiologia	6
5.1. Subsecção Bacteriologia I: análises bacteriológicas e micológicas.....	7
5.1.1. Sangue periférico	7
5.1.2. Líquido cefalorraquidiano (LCR).....	9
5.1.3. Líquidos pleural, peritoneal e sinovial.....	11
5.1.4. Exsudado purulento superficial e profundo.....	12
5.1.5. Exsudado faríngeo.....	14
5.1.6. Exsudado nasal	14
5.1.7. Amostras do trato respiratório inferior	15
5.1.7.1. Expetoração e Aspirado traqueal	15
5.1.7.2. Secreções brônquicas e Lavado bronco-alveolar	16
5.1.8. Fezes.....	17
5.2. Subsecção Bacteriologia 2: análises bacteriológicas, micológicas e parasitológicas...20	
5.2.1. Urina.....	20
5.2.2. Exsudado vaginal e uretral.....	23
5.3. Subsecção Micobacteriologia.....	25
5.3.1. Análise das amostras de rotina.....	25
5.4. Métodos de identificação manual	28
5.4.1. Teste de oxidase.....	28
5.4.2. Teste da catalase.....	29
5.4.3. Teste da coagulase.....	29

5.5.	Métodos automáticos de identificação de microrganismos	29
5.6.	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)	30
5.7.	Subsecção Parasitologia	32
5.7.1.	Fezes.....	32
6.	Secção Endocrinologia.....	33
6.1.	Amostras.....	34
6.2.	Metodologias.....	34
6.2.1.	Imunoensaios.....	34
6.2.2.	<i>ElectroChemiluminescence ImmunoAssay</i> (ECLIA).....	35
6.2.3.	<i>Chemiluminescence ImmunoAssay</i> (CLIA).....	36
6.2.4.	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	36
6.3.	Determinações analíticas.....	37
6.3.1.	Marcadores tumorais.....	37
6.3.1.1.	Antigénio específico da próstata (PSA)	37
6.3.1.2.	Antigénio carcino embrionário (CEA).....	38
6.3.1.3.	Alfa I-fetoproteína (AFP)	38
6.3.1.4.	Antigénio carboidrato 125 (CA 125).....	38
6.3.1.5.	Antigénio carboidrato 19-9 (CA 19-9).....	39
6.3.1.6.	Antigénio carboidrato 15-3 (CA 15-3).....	39
6.3.1.7.	Antigénio carboidrato 72-4 (CA 72-4).....	39
6.3.1.8.	Enolase neuro-específica (NSE).....	40
6.3.1.9.	Citoqueratina fração 21-1 (Cyfra 21-1)	40
6.3.2.	Função tiroidea	40
6.3.2.1.	Tirotropina (TSH), Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4).....	41
6.3.2.2.	Anticorpos anti-tiroideos	42
6.3.2.3.	Tiroglobulina	43
6.3.2.4.	Calcitonina	43
6.3.3.	Marcadores cardíacos.....	43
6.3.3.1.	Mioglobina.....	44
6.3.3.2.	Troponina T de alta sensibilidade (cTnT-hs)	44
6.3.3.3.	N-terminal proBNP (NT-proBNP)	44
6.3.4.	Função suprarrenal e Marcadores de hipertensão secundária.....	45
6.3.4.1.	Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) e Cortisol.....	45
6.3.4.2.	Renina e Aldosterona.....	45
6.3.4.3.	Catecolaminas e seus derivados	46
6.3.5.	Estudo de diabetes <i>mellitus</i>	46
6.3.5.1.	Insulina e Peptídeo C.....	46
6.3.6.	Estudo de anemias.....	47

6.3.6.1.	Folato, Vitamina B12 e Anticorpo anti-Fator Intrínseco	47
6.3.6.2.	Ferritina	48
6.3.6.3.	Eritropoietina	48
6.3.7.	Metabolismo ósseo.....	48
6.3.7.1.	Paratormona (PTH)	48
6.3.7.2.	Vitamina D total.....	49
6.3.8.	Hormonas da fertilidade	49
6.3.8.1.	Hormona Folículo-Estimulante (FSH) e Hormona Luteinizante (LH)	49
6.3.8.2.	17β-estradiol e Progesterona	50
6.3.8.3.	Testosterona total e livre.....	50
6.3.8.4.	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i> (SHBG)	51
6.3.8.5.	Sulfato de Dehidroepiandrosterona (DHEA-S).....	51
6.3.8.6.	Hormona Gonadotrópica Coriónica Humana (HCG).....	51
6.3.8.7.	Prolactina.....	52
7.	Casos Clínicos	52
7.1.	Caso 1 – Múltiplas Infecções do Trato Urinário (ITU)	52
7.2.	Caso 2 – Insuficiência Renal Crónica (IRC) em Estádio V.....	54
8.	Fase pós-analítica	57
9.	Controlo de qualidade.....	57
9.1.	Controlo de qualidade interno (CQI)	58
9.2.	Avaliação externa de qualidade (AEQ)	59
10.	Conclusões.....	60
11.	Referências Bibliográficas.....	61
12.	Anexos	69
	Anexo 1. Conceitos introdutórios de Microbiologia.....	69
	Anexo 2. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Microbiologia.....	71
	Anexo 3. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Hematologia.	72
	Anexo 4. Equipamentos, metodologias e parâmetros da subsecção Serologia.....	73
	Anexo 5. Equipamentos da subsecção Biologia Molecular.	74
	Anexo 6. Amostras, metodologias e parâmetros da subsecção Biologia Molecular.....	75
	Anexo 7. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Endocrinologia.	76
	Anexo 8. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Bioquímica.....	78
	Anexo 9. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Imunologia.....	79
	Anexo 10. Parâmetros de alergias e hipersensibilidade da secção Imunologia.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de hemólise em meio CSB com β -hemólise por <i>Streptococcus pyogenes</i> (A), α -hemólise por <i>Escherichia coli</i> (B) e γ -hemólise por <i>Staphylococcus epidermidis</i> (C). [5].....	8
Figura 2. Colónias MRSA negativas e positivas no meio de cultura MRSM. (Fotografia tirada no SPC do HNM).....	14
Figura 3. A) Meio SS com colónias incolores (<i>Shigella</i> spp.) e de centro negro (<i>Salmonella</i> spp.); B) Meio SMAC com colónias incolores (EHEC) e rosas (<i>Escherichia coli</i>); C) Meio CAMPY cujo lado direito foi inoculado com <i>Campylobacter jejuni</i> . [4].....	18
Figura 4. Meio Uriline com geloses MacConkey e CLED em faces opostas. (Fotografia tirada no SPC do HNM).....	20
Figura 5. Representação do crescimento microbiológico no meio CLED e do resultado correspondente em UFC/mL. [15].....	21
Figura 6. Colónias de <i>Candida albicans</i> em gelose CAN2. (Fotografia tirada no SPC do HNM).	23
Figura 7. Coloração de Gram de exsudado vaginal com: (A) trofozoíto de <i>Trichomonas vaginalis</i> [19]; (B) clue cells [19]; (C) formas leveduriformes coradas a roxo e (D) pseudohifas coradas a roxo. (C e D – Fotografias tiradas no SPC do HNM).....	24
Figura 8. Exame cultural positivo com colónias de micobactérias CMT. Esquerda – meio Löwenstein-Jensen. Direita – meio MGIT. (Fotografia tirada no SPC do HNM).....	27
Figura 9. Observação ao microscópio, na objetiva de 40x, de um ovo de <i>Taenia</i> spp. Preparação corada com Lugol. (Fotografia tirada no SPC do HNM).....	32
Figura 10. Glândulas do sistema endócrino. [29].....	33
Figura 11. Mecanismo de retrocontrolo negativo do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide. [49]	40
Figura 12. Representação da constituição da parede celular de bactérias de Gram negativo (A) Gram positivo (B) e micobactérias (C). [90]	69

Índice de Tabelas

Tabela 1. Organização estrutural das secções do SPC do HNM.....	1
Tabela 2. Tubos para colheita de sangue, respetiva amostra e utilização nas secções do SPC.	5
Tabela 3. Exame microscópico e cultural dos frascos de hemocultura.	8
Tabela 4. Exame microscópico e cultural de LCR.....	10
Tabela 5. Exame microscópico e cultural de líquidos pleural, peritoneal e sinovial.....	11
Tabela 6. Exame microscópico e cultural de exsudado purulento superficial e profundo.	13
Tabela 7. Critérios de Murray e Washington.	16
Tabela 8. Exame macroscópico, microscópico e cultural de amostras do trato respiratório inferior.....	16
Tabela 9. Exame macroscópico e cultural de amostras de fezes.....	18
Tabela 10. Parâmetros de quantificação do exame citológico do sedimento urinário.....	21
Tabela 11. Análise macroscópica de colónias de agentes patogénicos em meio Uriselect4. (Fotografias tiradas no SPC do HNM).....	22
Tabela 12. Exame microscópico e cultural de exsudado vaginal e uretral.....	24
Tabela 13. Densidade do inóculo, em McFarland (McF), adequada a cada microrganismo.	31
Tabela 14. Interpretação dos testes de primeira linha do SPC para a função tiroidea. [49] ..	41
Tabela 15. Prevalência dos anticorpos anti-tiroideos. [49] ..	43
Tabela 16. Resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), adaptados do boletim de análises do SPC do HNM.	53
Tabela 17. Resultados obtidos pré-diálise, adaptados do boletim de análises do SPC do HNM.....	55

Lista de Abreviaturas

- ABEI – *N-(4-Aminobutyl)-N-Ethylisoluminol*
- ACSA – *Agencia de Calidad Sanitaria de Andalucía*
- ACTH – *Hormona Adrenocorticotrófica (Adrenocorticotropic Hormone)*
- AEQ – *Avaliação Externa de Qualidade*
- AFP – *Alfa I-fetoproteína (Alpha-fetoprotein)*
- AL – *Anticoagulante Lúpico*
- AMA – *Anticorpos Anti-Mitocôndria (Anti-Mitochondrial Antibodies)*
- ANA – *Anticorpos Anti-Nucleares (Anti-Nuclear Antibodies)*
- ANCA – *Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilo (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies)*
- ASCA – *Anticorpos Anti-Saccharomyces cerevisiae*
- BAAR – *Bacilos Ácido-Álcool Resistentes*
- BMAT – *Brucella Micoagglutination Test*
- BNP – *Peptídeo Natriurético do tipo B*
- CIq – *Fragmento q do componente I do complemento*
- C3 – *Componente 3 do complemento*
- C4 – *Componente 4 do complemento*
- CA 125 – *Antigénio Carboidrato 125 (Carbohydrate antigen 125)*
- CA 15-3 – *Antigénio Carboidrato 15-3 (Carbohydrate antigen 15-3)*
- CA 19-9 – *Antigénio Carboidrato 19-9 (Carbohydrate antigen 19-9)*
- CA 72-4 – *Antigénio Carboidrato 72-4 (Carbohydrate antigen 72-4)*
- CAMPY – *Campylobacter agar*
- CAN2 – *Meio Candida*
- CEA – *Antigénio Carcino Embrionário (Carcinoembryonic Antigen)*
- CENP A – *Proteína A do centrómero*
- CENP B – *Proteína B do centrómero*
- CHCA – *alfa-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid*
- CHCM – *Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média*
- CHOC-PVS – *Chocolate enriquecido com Suplemento PoliVitamínico*
- CLED – *Cystine Lactose Electrolyte-Deficient*
- CLIA – *Chemiluminescence ImmunoAssay*
- CMI – *Concentração Mínima Inibitória*
- CMT – *Complexo Mycobacterium tuberculosis*
- cN-IA – *5'-nucleotidase citosólica IA*

CQI – Controlo Qualidade Interno
CSB – Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (*Columbia Sheep Blood*)
cTnT-hs – Troponina T de alta sensibilidade
Cyfra 21-1 – Citoqueratina fração 21-1 (*Cytokeratin fragment 21-1*)
DFS70 – Anticorpos *Dense fine speckled*
DHEA-S – Sulfato de Dehidroepiandrosterona
DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
dRVVT – *Dilute Russell's Viper Venom Time*
dsDNA – Ácido desoxirribonucleico de dupla cadeia
EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio
ECLIA – *ElectroChemiluminescence ImmunoAssay*
EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)
EJ – Glicil-ácido ribonucleico de transferência sintase
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ENA – Antígenos Nucleares Extraíveis (*Extractable Nuclear Antigen*)
EQAS – *The External Quality Assurance Services*
ESBL – β -lactamase de Espectro Alargado (*Extended Spectrum β -Lactamase*)
FFP3 – *Filtering Face Pieces 3*
FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FITC – *Fluorescein Isothiocyanate Isomer*
FSH – Hormona Folículo-Estimulante (*Follicle Stimulating Hormone*)
FT3 – Triiodotironina Livre
FT4 – Tiroxina Livre
GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotropinas (*Gonadotropin-Releasing Hormone*)
gp210 – Glicoproteína 210
HAEM – Gelose Chocolate *Haemophilus*
HCG – Hormona Gonadotrópica Coriônica Humana (*Human Chorionic Gonadotropin*)
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
HNM – Hospital Dr. Nélio Mendonça
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
IFA – *Indirect Fluorescent Antibody*
INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IRC – Insuficiência Renal Crónica
ITU – Infecções do Trato Urinário

Jo-I – Histidil-ácido ribonucleico de transferência
K₂-EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético dipotássico
LC-I – Antígeno citosólico de tipo I do fígado
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
LH – Hormona Luteinizante (*Luteinising hormone*)
LKM-I – Anticorpos anti-microsoma de rim e fígado
MALDI-TOF-MS – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*
MBG – Membrana basal glomerular
McF – McFarland
MCK – MacConkey
MGIT – *Mycobacteria Growth Indicator Tube*
Mi-2 – Antígeno miosite
MLDA – *Meat Liver Dextrose Agar*
MPO – Mieloperoxidase
MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (*Meticilin Resistant Staphylococcus aureus*)
MRSM – Meio *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina
MSA – Manitol Salgado Agar
NAD – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*
NSE – Enolase Neuro-Específica (*Neuron Specific Enolase*)
NT-proBNP – N-terminal pró Peptídeo Natriurético do tipo B
OJ – Isoleucil-ácido ribonucleico de transferência sintase
PCNA – Antígeno nuclear de células proliferadoras
PDGFR – Recetor para o fator de crescimento derivado de plaquetas
PGDH – hidroxiprostaglandina desidrogenase
PL-7 – Treonina-ácido ribonucleico de transferência sintase
PM – Poliomiosite
PML – Leucemia promielocítica
PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
PR3 – Proteinase 3
Prot.-P-rib. – Proteína P ribossomal
PSA – Antígeno Específico da Próstata (*Prostate Specific Antigen*)
PTH – Paratormona
RAM – Região Autónoma da Madeira
RBC – Rótulo e Código de Barras

RDW – *Red Cell Distribution Width*
RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*
RNA – *Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)*
RP – Polimerase 3 de ácido ribonucleico
RPCA – Resistência à Proteína C Ativada
rpm – Rotações por minuto
RPR – *Rapid Plasmin Reagin*
RT-PCR – *Real Time - Polymerase Chain Reaction*
SAEI – Subunidade I da enzima de ativação do modificador pequeno semelhante à ubiquitina
Scl – Escleroderma
SCT – *Silica Clotting Time*
SDA – Sabouraud Dextrose Agar
SESARAM – Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira
SHBG – *Sex Hormone Binding Globulin*
SHU – Síndrome Hemolítica-Urémica
SIL – Sistema Informático Laboratorial
SLA/LP – Antígeno hepático solúvel/antígeno fígado-pâncreas
Sm – Antígeno Smith
SMAC – Sorbitol MacConkey Agar
SNC – Sistema Nervoso Central
SPC – Serviço de Patologia Clínica
SRAA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SRP – Partículas de reconhecimento de sinal
SS – *Salmonella Shigella*
SS-A – Antígeno A de síndrome de Sjögren
SS-B – Antígeno B de síndrome de Sjögren
STEC – *Shiga Toxin Escherichia coli*
T3 – Triiodotironina
T4 – Tiroxina
TDA – Triptofano Desaminase
Tg – Tiroglobulina
TMB – Tetrametilbenzidina
TP – Tempo de Protrombina
TPA – Tripopilamina

TPO – Peroxidase Específica da Tiróide (*Thyroid peroxidase*)
TRAb – Autoanticorpos contra o recetor da TSH (*TSH receptor antibody*)
TRH – Hormona Libertadora de Tirotrópina (*Thyrotropin Releasing Hormone*)
TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSH – Hormona Estimulante da Tiróide (*Thyroid Stimulating Hormone*)
TT – Tempo de Trombina
TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
UI-snRNP – Componente UI da ribonucleoproteína nuclear pequena
UFC – Unidades Formadoras de Colónias
UK NEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Service*
VCM – Volume Corpuscular Médio
VDRL – *Venereal Disease Research Laboratory*
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Resumo

O presente relatório encontra-se inserido no contexto do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Este estágio curricular teve como principais objetivos a aplicação de conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo das diversas unidades curriculares, bem como proporcionar uma oportunidade de contacto, por um período de cinco meses, com os serviços prestados pelo Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital Dr. Nélio Mendonça (HNM).

Neste relatório são abordadas as diversas secções do SPC, nomeadamente a Hematologia, Microbiologia, Serologia, Biologia Molecular, Bioquímica, Endocrinologia e Imunologia. De modo geral, o SPC é brevemente descrito em termos de organização espacial, principais amostras recebidas, processos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos e sistemas de controlo de qualidade implementados. No entanto, apenas as secções de Microbiologia e Endocrinologia serão descritas em maior pormenor, no que diz respeito às metodologias utilizadas, parâmetros analíticos, validação de resultados e interpretação de casos clínicos que surgiram durante o decorrer do estágio.

Palavras-chave: Patologia Clínica; Análises Clínicas; Microbiologia; Endocrinologia.

Abstract

This report is inherent of the curricular internship of the Master's in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra (FFUC). This internship aimed to apply practical and theoretical knowledge acquired over several curricular units, as well as providing an opportunity of contact, for five months, with the services provided by the Clinical Pathology Laboratory (SPC) of the Hospital Dr. Nélio Mendonça (HNM).

This report addresses the different sections of the SPC, namely Hematology, Microbiology, Serology, Molecular Biology, Biochemistry, Endocrinology and Immunology. In general, the SPC is briefly described in terms of spatial organization, main samples received, pre-analytical, analytical and post-analytical processes, and the implemented quality control systems. However, only the Microbiology and Endocrinology sections will be described in greater detail, with regard to the methodologies used, analytical parameters, validation of results and interpretation of clinical cases that emerged during the internship.

Keywords: Clinical Pathology; Clinical Analysis; Microbiology; Endocrinology.

1. Introdução

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) é um laboratório de análises clínicas e como tal representa um estabelecimento de saúde que recorre a um conjunto extenso de profissionais de saúde, metodologias e equipamentos laboratoriais para garantir a implementação de cuidados de prevenção, prognóstico, diagnóstico, escolha e monitorização do tratamento, permitindo assim detetar e corrigir desequilíbrios no estado fisiológico do utente.

O presente relatório foi elaborado aquando da realização do estágio curricular inserido no plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital Dr. Nélio Mendonça (HNM), unidade hospitalar central da Região Autónoma da Madeira (RAM). O estágio curricular teve como principais objetivos proporcionar uma experiência imersiva de cinco meses no meio profissional laboratorial, bem como permitir a aplicação de conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo das unidades curriculares do curso.

Este relatório descreve o SPC do HNM em termos de fase pré-analítica, analítica e pós-analítica. Na fase analítica são abordadas de forma mais detalhada as secções da Microbiologia e da Endocrinologia. No final do relatório são apresentados alguns casos clínicos que surgiram durante o estágio, bem como o sistema de controlo de qualidade implementado.

2. Caracterização do laboratório

O Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira (SESARAM) é formado por todas as instituições públicas na RAM, nomeadamente o HNM, o Hospital dos Marmeleiros, o Hospital Dr. João de Almada, a Casa de Saúde São João de Deus, a Casa de Saúde Câmara Pestana, o Centro Dr. Agostinho Cardoso, Estabelecimento Prisional, Lar Bela Vista e cuidados de saúde primários, contando com 47 centros de saúde.

Tabela I. Organização estrutural das secções do SPC do HNM.

Secções Técnicas	Hematologia	
	LabCore	Bioquímica
		Endocrinologia
		Imunologia
		Rastreio Pré-Natal
	Urina Tipo II e Sangue Oculto (Secção pertencente à Bioquímica)	
	Microbiologia	Parasitologia
		Bacteriologia I e 2
		Micobacteriologia
Serologia e Biologia Molecular		

O SPC é dirigido pelo Dr. Nuno Canhoto, Assistente Graduado da especialidade em Patologia Clínica, com subespecialidade em Microbiologia Médica. O SPC foi instalado em maio de 2007 no núcleo de apoio do HNM e presta cuidados de saúde às diversas instalações do HNM (serviços de internamento, unidades de cuidados intensivos e cuidados intermédios, blocos operatórios, urgências referenciadas e consultas externas), bem como às restantes instalações do SESARAM. O SPC possui diversas secções técnicas (Tabela 1), salas de colheita, um posto de colheitas no centro de saúde do Bom Jesus e uma unidade de saúde no Porto Santo. O SPC recebe em média 1300 amostras por dia e dispõe de Assistentes Operacionais, Assistentes Técnicos, Técnicos Superiores, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica e por médicos especialistas em Patologia Clínica.

3. Funções desempenhadas

Ao longo do estágio procedi à manutenção dos equipamentos, calibração e controlo de qualidade, bem como acompanhei de modo observacional a validação dos resultados.

3.1. Secção Microbiologia

A Microbiologia, secção abordada com maior detalhe no relatório, constitui um ramo da ciência que se dedica ao estudo de microrganismos, classificados em bactérias, micobactérias, fungos, parasitas e vírus (Anexo 1). Nesta secção, adquiri aptidões teórico-práticas para o estudo microbiológico de amostras de rotina. Observei exames a fresco, após coloração manual (Lugol para observação de parasitas) e após coloração automática de Gram e Ziehl-Neelsen, obtidas por equipamentos *Aerospray* (Anexo 2). Realizei também exames culturais para avaliar o crescimento microbiano em diferentes meios de cultura e condições de incubação. Além disso, procedi à identificação microbiana por MALDI-TOF-MS (Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz, acoplada a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo) e ao Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) por VITEK-2.

3.2. Secção Hematologia

A Secção de Hematologia contempla o estudo das doenças do sangue (as patologias com as quais me deparei com maior frequência foram as anemias e hemoglobinopatias), hemostasia (alterações no processo de coagulação), bem como da medula óssea. Esta secção encontra-se dividida em três partes: microscopia ótica, citometria de fluxo e analítica, na qual realizei o estágio. Na área da microscopia ótica são realizados esfregaços sanguíneos e de aspirados medulares, bem como o estudo citológico do líquido cefalorraquidiano (LCR) em

câmara de Neubauer. Na área de citometria de fluxo é realizada a imunofenotipagem do sangue periférico e aspirado medular.

Na parte analítica, procedi à determinação, em amostras de sangue em tubo com K₂-EDTA, do hemograma, velocidade de sedimentação, separação de hemoglobinas, esfregaço sanguíneo e prova de fragilidade osmótica. Em particular, no hemograma são quantificados os leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, eritrócitos, hemoglobina, plaquetas e reticulócitos. São também avaliados parâmetros como o hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e *Red Cell Distribution Width* (RDW). Realizei igualmente a determinação dos parâmetros da hemóstase em amostras de sangue em tubo com citrato de sódio pelo equipamento ACLTOP 750^{CTS} (Anexo 3).

3.3. Secção Serologia e Biologia Molecular

Na subsecção Serologia, apliquei diversos métodos manuais e automáticos (Anexo 4) que se baseiam na reação específica antigénio-anticorpo para detetar antigénios de um microrganismo patogénico ou então para detetar anticorpos produzidos em resposta a uma infeção recente ou passada. Adicionalmente, também realizei análises serológicas em contexto de transplantes de medula e órgãos sólidos, bem como em contexto de exames pré-natais. Na subsecção de Serologia a principal amostra analisada é o soro, porém também tive a oportunidade de determinar diversos parâmetros em amostras de plasma, urina, fezes e líquido cefalorraquidiano (LCR).

Na subsecção de Biologia Molecular acompanhei de modo observacional o processo RT-PCR (*Real Time - Polymerase Chain Reaction*) que permite a amplificação e deteção de sequências específicas de ácidos nucleicos de microrganismos extraídas na amostra, com a finalidade de diagnosticar infeções respiratórias, neurológicas, sistémicas, sexualmente transmissíveis e gastrointestinais, bem como a pesquisa de genes associados a resistências bacterianas (Anexos 5 e 6). Os testes de Biologia Molecular são utilizados para fornecer um diagnóstico rápido e preciso no caso de suspeita de uma infeção e na monitorização de infeções em indivíduos transplantados renais. Adicionalmente, são utilizados testes rápidos de RT-PCR em cartucho (*GeneXpert* e *LIAT*) para a deteção de ácido ribonucleico (RNA) de SARS-CoV-2 em amostras de zangaratoas nasais, sob situações de diagnóstico urgente. Por fim, o *FilmArray* é também um teste rápido RT-PCR, porém permite a deteção simultânea de ácidos nucleicos de um painel de microrganismos patogénicos (RT-PCR *multiplex*), sendo utilizado com teste de segunda ou terceira linha na secção (Anexo 6).

3.4. Secção Endocrinologia

A secção de Endocrinologia, abordada com maior detalhe no relatório, constitui um ramo da Bioquímica que se dedica ao diagnóstico e tratamento de perturbações no sistema endócrino e no metabolismo geral, na qual adquiri aptidões teórico-práticas para a determinação de diversos parâmetros, nomeadamente para a avaliação da função tiroidea, suprarrenal, cardíaca e hormonas da fertilidade. Adicionalmente, tive a oportunidade de determinar inúmeros marcadores tumorais e marcadores de hipertensão secundária, anemia, metabolismo ósseo e diabetes (Anexo 7). Na secção de Endocrinologia a principal amostra analisada é o soro, porém diversos analitos são doseados no plasma ou na urina de 24 horas.

3.5. Secção Bioquímica

A Bioquímica constitui uma valência central no diagnóstico de grande parte das patologias, uma vez que integra um painel de parâmetros que avaliam inúmeras perturbações metabólicas. As principais determinações realizadas nesta secção para as amostras de soro e urina (amostras mais comuns) encontram-se descritas no Anexo 8. No referido anexo está assinalado também o exame de Urina Tipo II e o teste de sangue oculto (hemoglobina fecal) usado no rastreio do cancro colorretal. Adicionalmente, como a maioria dos métodos são colorimétricos, espectrofotométricos, imunoturbidimétricos e potenciométricos, a medição dos parâmetros é afetada por interferentes de hemólise, icterícia e lipemia na amostra.

3.6. Secção Imunologia

A Imunologia é um ramo da ciência que estuda os elementos do sistema imunológico, sendo uma ferramenta essencial no diagnóstico e monitorização de patologias como as doenças autoimunes, processos alérgicos e de hipersensibilidade, imunodeficiências e gamopatias (monoclonais e policlonais). A principal amostra analisada é o soro, porém realiza-se a determinação de proteína de Bence-Jones na urina para o diagnóstico de gamopatias (por exemplo, mieloma múltiplo) e de calprotectina em fezes para o diagnóstico de doenças inflamatórias intestinais (por exemplo, doença de Crohn e colite ulcerosa), ver Anexo 9.

A pesquisa de anticorpos IgE totais e específicos, associados a reações alérgicas e hipersensibilidades, é realizada no equipamento *ImmunoCap 250, Thermo Scientific*. Quanto às IgE específicas (produzidas em resposta a um determinado alérgénio), a sua pesquisa no soro é primeiramente realizada contra conjuntos *Multirast* de alérgénios. Caso o *Multirast* seja positivo, as IgE são analisadas individualmente (Anexos 9 e 10). Adicionalmente é realizado o doseamento da triptase para o diagnóstico de reação anafilática e mastocitose.

Participei no *screening* de doenças autoimunes (por exemplo, lúpus eritematoso sistémico, esclerose sistémica, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, doença mista do tecido conectivo, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, miosite inflamatória autoimune, síndrome anti-fosfolipídica, vasculites, doença celíaca e doenças inflamatórias intestinais) através da deteção de ANA (anticorpos antinucleares), ANCA (anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo) e AMA (anticorpos anti-mitocôndria) por imunofluorescência em lâminas de tecidos, respetivamente, contendo células Hep-2 do carcinoma da laringe humana, neutrófilos e uma mistura de tecidos de roedor (gástrico e rim). Após, realiza-se a pesquisa individual dos anticorpos específicos destas patologias através das técnicas CLIA (*Chemiluminescence ImmunoAssay*), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e *Immunoblot*, ver Anexo 9.

Por fim, na secção de Imunologia procedi ao estudo das proteínas séricas por imunonefometria e eletroforese capilar (proteínograma e imunodeslocamento) sobretudo para monitorizar utentes com gamopatias (por exemplo, mieloma múltiplo), ver Anexo 9.

4. Fase pré-analítica

A fase pré-analítica compreende todo o conjunto de procedimentos que antecedem a análise da amostra e que garantem a qualidade da mesma, tais como a requisição clínica, preparação do utente (necessidade de realizar jejum, restrição alimentar específica, hora e condições da colheita, entre outros), colheita, transporte, conservação, receção e triagem.

Tabela 2. Tubos para colheita de sangue, respetiva amostra e utilização nas secções do SPC.

Ordem	Tubo de colheita	Amostra	Secções
1º	Frasco de hemocultura	Sangue total	Microbiologia
2º	Tubo com anticoagulante Citrato de sódio (1:9)	Plasma	Hematologia
3º	Tubo com gel separador e com ativador de coagulação	Soro	Bioquímica, Endocrinologia, Serologia, Biologia Molecular e Imunologia
4º	Tubo com anticoagulante K ₂ -EDTA	Sangue total Plasma	Hematologia, Bioquímica, Endocrinologia, Serologia e Biologia Molecular
5º	Tubo com fluoreto de sódio	Plasma	Bioquímica (medição de glicémia)

O processo inicia-se com a elaboração da requisição pelo clínico/serviço. A requisição de amostras para análises no SPC é realizada quase totalmente por via eletrónica, sendo automaticamente transmitida para o Sistema Informático Laboratorial (SIL), denominado por ModuLab Gold, versão 3.0.00. (Werfen) e *Infinity* (ROCHE). As amostras colhidas no HNM

são encaminhadas para as diferentes secções após identificação com rótulo e código de barras (RCB). As restantes amostras dos serviços SESARAM e dos domicílios são acondicionadas em contentores térmicos e depois são transportadas ao SPC pelo serviço de transporte do Serviço Regional de Saúde. As amostras colhidas no Porto Santo são acondicionadas e transportadas por avião. Para a colheita de amostras de sangue periférico, recorre-se a diversos tubos específicos (Tabela 2), segundo uma determinada ordem de colheita.

À chegada do laboratório é medida a temperatura dos contentores, sendo registada juntamente com a data e hora. Na triagem, um técnico procede à confirmação da correspondência da amostra com a requisição, bem como da identificação do utente e qualidade do produto. Assim que é dada a entrada no SIL, as amostras são distribuídas pelas diversas secções do SPC por Assistentes Operacionais e depois submetidas ao seu processamento analítico ou pela cadeia de distribuição robótica de alíquotas de soro e urina, Cobas (ROCHE), existente no *LabCore*. Esta cadeia de distribuição permite realizar a separação de alíquotas de soro e urina para a linha de equipamentos Cobas, ROCHE, da Bioquímica e Endocrinologia. Os tubos de amostra são colocados na cadeia robótica, na qual é lido o RCB e são processados de acordo com a requisição clínica presente no SIL. Ocorre a descapsulação dos tubos e doseamento dos respetivos parâmetros na linha de equipamentos Cobas, ROCHE. Caso as amostras contenham parâmetros de outras secções (Imunologia, Urina Tipo II, Serologia e Biologia Molecular) são colocadas num módulo separado de triagem.

As amostras com requisição de parâmetros não analisados pelo SPC são enviadas ao Centro de investigação do SESARAM, Serviço de Sangue e Medicina Transfusional, Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e ao Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves.

5. Secção Microbiologia

A deteção e identificação de microrganismos patogénicos ou potencialmente patogénicos em produtos biológicos constitui a base do diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas e, portanto, da Microbiologia clínica. Adicionalmente, para validar um resultado de modo fidedigno é necessário conhecer quais são os microrganismos pertencentes à microbiota humana, bem como os principais agentes etiológicos associados à infeção analisada. De modo geral, realiza-se o isolamento dos microrganismos em meios de cultura, identificação e depois determina-se o seu perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos, através do método TSA. Os processos de identificação (manual e automático) e TSA serão abordados em maior pormenor nas páginas 28-32.

5.1. Subsecção Bacteriologia I: análises bacteriológicas e micológicas

5.1.1. Sangue periférico

O sangue, em condições fisiológicas, constitui um fluido biológico estéril, portanto a presença de bactérias no sangue (denominada bacteriemia) ou de fungos (fungemia) representam um estado grave de infecção, seja esta transitória, intermitente ou contínua. Adicionalmente, os produtos metabólicos e toxinas gerados pelo microrganismo circulam pelo organismo, ativando o sistema imunitário, podendo levar à septicemia. A bacteriemia pode ter origem intravascular, sendo resultante de, por exemplo, endocardites e de cateteres intravenosos contaminados. Porém a origem mais comum de bacteriemia é pela circulação linfática de um local de infecção primário localizado. [1]

Os microrganismos cuja detecção no sangue possui a maior relevância clínica são: *Enterobacteriaceae* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* β -hemolítico, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, grupo HACEK (*Haemophilus* spp., *Actinobacillus* spp., *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, e *Kingella kingae*), anaeróbios e leveduras. Por outro lado, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* spp., *Propionibacterium* spp. e *Corynebacterium* spp. são contaminantes da microbiota da pele. [1, 2]

O sangue periférico é colhido em frascos de hemocultura. Estes são incubados a 35°C no equipamento automatizado BACTEC 9240 BD, que é um aparelho otimizado para detecção do crescimento de bactérias ou fungos. O período de incubação é definido para cinco dias, porém na suspeita de microrganismos fastidiosos ou de endocardite é estendido a 10 dias. Atenta-se que os frascos micológicos têm um período de incubação de 14 dias. Se existirem microrganismos na amostra de sangue haverá produção de dióxido de carbono no interior do frasco de hemocultura, uma vez que é resultante do metabolismo dos mesmos no meio. O dióxido de carbono reage com o corante presente no fundo do frasco de hemocultura, resultando na sua mudança de cor e emissão de fluorescência. Foto-detetores medem a intensidade de fluorescência a cada 10 minutos, assinalando a presença de microrganismos. [3]

Os frascos assinalados como negativos após o período de incubação são eliminados, enquanto os positivos são transportados para a bancada e confirma-se se há crescimento de colónias. Posteriormente, realiza-se um esfregaço sanguíneo que é de seguida corado pelo equipamento automático *Aerospray Gram*. O esfregaço corado é observado ao microscópio na objetiva de 100x e óleo de imersão para detetar bactérias (de Gram positivo ou negativo) ou fungos (leveduras ou filamentosos). Realizam-se também sementeiras por técnica de esgotamento em quadrante sob meios de cultura específicos, tal como se pode verificar na

Tabela 3. Quando os frascos de hemocultura anaeróbia são positivos realiza-se a subcultura em dois meios CSB, um é incubado em aerobiose e outro em anaerobiose (dentro duma jarra GasPak na estufa) para diferenciar bactérias anaeróbias estritas de anaeróbias facultativas.

Tabela 3. Exame microscópico e cultural dos frascos de hemocultura.

Produto	Exame Microscópico	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
Frasco pediátrico ou adulto aeróbio	Coloração Gram	Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (CSB)	O ₂	37°C (24 a 48h)
		Gelose Chocolate enriquecido com Suplemento PoliVitamínico (CHOC-PVS)	CO ₂ (5%)	
Frasco adulto anaeróbio	Coloração Gram	Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (CSB)	O ₂	
		Gelose Chocolate enriquecido com Suplemento PoliVitamínico (CHOC-PVS)	Anaerobiose em jarra GasPak	
Frasco micológico	Coloração Gram	Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro (CSB)	O ₂	
		Sabouraud Dextrose Agar (SDA)		

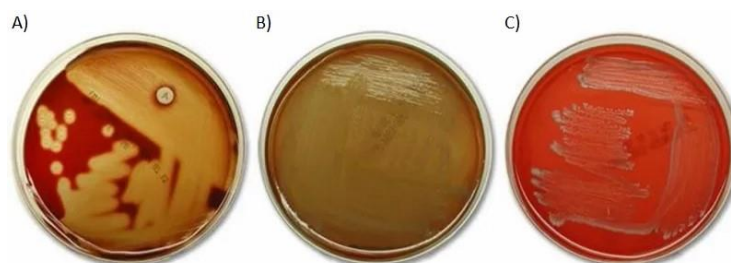


Figura 1. Tipos de hemólise em meio CSB com β -hemólise por *Streptococcus pyogenes* (A), α -hemólise por *Escherichia coli* (B) e γ -hemólise por *Staphylococcus epidermidis* (C). [5]

A gelose CSB é um meio não seletivo e enriquecido com peptonas, extrato de levedura e sangue de carneiro que fornece o fator X (hemina), permitindo assim o crescimento da maioria das espécies microbianas. A presença de sangue de carneiro permite discriminar o tipo de hemólise (β , α ou γ) provocado pela bactéria, sendo um critério de identificação da espécie (Figura 1). Consoante a capacidade das bactérias para lisar os eritrócitos do meio CSB, as colónias apresentam halos diferentes em seu redor. Se realizarem hemólise total (β -hemólise) geram um halo incolor, se realizarem hemólise parcial (α -hemólise) geram um halo esverdeado e se não realizarem hemólise (γ -hemólise) não há halo. Por outro lado, a gelose CHOC-PVS é um meio não seletivo particularmente recomendado para o crescimento de

estirpes fastidiosas que necessitam dos fatores X e V (Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina - NAD), tais como a *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. e *Streptococcus pneumoniae*. Este meio é uma variação da gelose CSB e é composto por uma base nutritiva de eritrócitos lisados por aquecimento, sendo também suplementado com fator V. [4]

O meio SDA foi desenvolvido por Sabouraud para o cultivo de dermatófitos e outros fungos. Apresenta um valor baixo pH (aproximadamente 5,6) que estimula o crescimento de fungos em deterioramento detrimento das bactérias presentes na amostra clínica. [4]

Procede-se depois à observação dos meios referidos na Tabela 3 às 24h de incubação. Se não houver crescimento às 24h observa-se após 48h de incubação. Tem-se em conta que geralmente, colónias mais pequenas são formadas por bactérias de Gram positivo, enquanto colónias maiores são formadas por bactérias de Gram negativo. Assim as colónias são valorizadas conforme a correspondência do seu aspecto nos meios com o exame microscópio, sendo encaminhadas para identificação e TSA. Caso exista mais do que um tipo de colónia no meio realiza-se a subcultura das mesmas de modo a isolá-las. Dada a gravidade deste tipo de infeções, os resultados preliminares são enviados ao médico requisitante logo que possível.

5.1.2. Líquido cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é um líquido límpido incolor e estéril que envolve o espaço subaracnóideo do cérebro e medula espinhal, sendo responsável por proteger mecanicamente o cérebro e reduzir o seu peso. É igualmente responsável pelo transporte e distribuição de nutrientes no Sistema Nervoso Central (SNC), bem como pela remoção de metabolitos celulares. [1]

Em condições fisiológicas normais o cérebro também é protegido pela barreira hematoencefálica contra a invasão microbiana. Assim, para que o SNC seja infetado por bactérias, fungos, parasitas ou vírus, a barreira hematoencefálica tem que se encontrar permeável. As bactérias e fungos geralmente provocam meningite purulenta, patologia definida como sendo uma inflamação do espaço subaracnóideo com a presença de exsudado purulento no LCR colhido. Encefalites e meningites assépticas são geralmente provocadas por vírus. [6]

Recém-nascidos são mais suscetíveis a desenvolverem meningite, nomeadamente por *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, pelo facto de possuírem um sistema imunológico imaturo, uma barreira hematoencefálica relativamente permeável e por entrarem em contacto com a microbiota do trato vaginal durante o parto. Em indivíduos com idades compreendidas entre os 2 e 50 anos, a *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* são as causas mais comuns de infeção. A partir dos 50 anos, a maioria dos casos de meningite é derivada de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* e bacilos

de Gram negativo [7]. Indivíduos imunocomprometidos podem desenvolver infecções micológicas no SNC, geralmente provocadas por leveduras (*Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp.), bem como por fungos dimórficos (*Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*). [8]

As amostras de LCR são recebidas, após colheita por punção lombar, num contentor estéril. Numa fase inicial, são analisadas macroscopicamente em termos de cor e turvação (em condições normais o LCR é límpido e incolor, sendo a turvação indicativa de uma infeção do SNC de origem bacteriana ou fúngica). Posteriormente, as amostras são centrifugadas e o sedimento é ressuspenso. Coloca-se uma gota de sedimento numa lâmina e após secagem realiza-se a coloração de Gram no equipamento automático *Aerospray*. Em seguida, realiza-se o exame microscópico na objetiva de 100x para detetar a presença de fungos (leveduras ou hifas) e de bactérias como, por exemplo, diplococos de Gram negativo intracelulares de *Neisseria meningitidis*, cocobacilos de Gram negativo de *Haemophilus influenza* e diplococos de Gram positivo capsulados de *Streptococcus pneumoniae*. Realiza-se posteriormente a inoculação de duas a três gotas de sedimento ressuspenso nos meios CSB, SDA e CHOC-PVS, sendo espalhadas com um semeador descartável. O restante do sedimento é inoculado no meio líquido não seletivo *Meat Liver Dextrose Agar* (MLDA), de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Exame microscópico e cultural de LCR.

Produto	Exame Microscópico	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
LCR	Coloração Gram	CSB, MLDA e SDA (casos de suspeita de infeção fúngica)	O ₂	37°C (24 a 48h)
		CHOC-PVS	CO ₂ (5%)	

Os meios são avaliados em termos de crescimento e aspecto de colónias às 24h de incubação, tendo em conta os resultados do exame microscópico por coloração de Gram. Caso não tenha sido observado crescimento de colónias reintroduz-se os meios na estufa até perfazer as 48h de incubação. Se o MLDA estiver turvo realizam-se subculturas para novos meios sólidos CSB, CHOC-PVS e SDA (apenas na suspeita de infeção fúngica) sendo incubados em condições idênticas aos meios sólidos primários (Tabela 4). A amostra é considerada estéril se no final deste período não apresentar crescimento nos meios. As colónias isoladas são sempre valorizadas nesta amostra e conduzidas para identificação e TSA. Dado o carácter urgente do diagnóstico das infeções do SNC, o LCR tem prioridade no processamento de amostras, sendo os resultados preliminares disponibilizados assim que possível.

5.1.3. Líquidos pleural, peritoneal e sinovial

O líquido pleural lubrifica as superfícies da pleura (membrana que reveste os pulmões), sendo um líquido estéril em condições normais. Em resultado de inflamação e infeção no espaço pleural há uma acumulação de líquido (derrame pleural) que em algumas situações, como num estado avançado de pneumonia, pode apresentar um aspecto purulento (empiema) [1]. Os casos de empiema adquiridos na comunidade são geralmente causados *Streptococcus milleri*, *Streptococcus pneumoniae* e bactérias anaeróbias. Por outro lado, os casos de empiema adquiridos em ambiente hospitalar são geralmente causados por *Staphylococcus aureus* (incluindo *Staphylococcus aureus* meticilina resistente – MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*. O empiema fúngico é raro e está associado comumente a *Candida* spp. [9]

O líquido peritoneal é um líquido estéril e encontra-se na cavidade peritoneal, que contém o fígado, pâncreas, baço, estômago, intestino, bexiga, trompas de Falópio e ovários. A peritonite corresponde à inflamação da membrana peritoneal e pode ser classificada como primária ou secundária. A peritonite primária origina-se pela disseminação de microrganismos no sangue e dos gânglios linfáticos. Os agentes etiológicos mais comuns são o *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus* spp. e *Enterobacteriaceae* spp. Em indivíduos imunossuprimidos a peritonite fúngica é causada por *Candida* spp. [1]

O líquido sinovial é um líquido estéril, límpido e viscoso que se encontra no interior das articulações. A artrite pode resultar de bacteriemia ou, menos frequentemente, de uma infeção fúngica. Os agentes etiológicos mais comuns são o *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* e bactérias anaeróbias. [1]

Tabela 5. Exame microscópico e cultural de líquidos pleural, peritoneal e sinovial.

Exame Microscópico	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
Coloração Gram	CSB	Anaerobiose em jarra GasPak	37°C (24 a 48h)
		O ₂	
	MLDA e SDA (casos de suspeita de infeção fúngica)	O ₂	
	CHOC-PVS	CO ₂ (5%)	

As amostras de líquidos pleural, peritoneal e sinovial são recebidas em contentores estéreis e analisadas macroscopicamente em termos de turvação (indicadora de infeção). As amostras líquidas devem ser concentradas por centrifugação e o precipitado ressuspenso, enquanto as amostras purulentas podem ser analisadas diretamente. Em seguida, a partir do

sedimento ressuspensionado ou amostra purulenta, realiza-se um esfregaço circular em lâmina com uma ansa descartável. Depois da secagem, a lâmina é corada pela técnica de Gram no equipamento automático e analisada ao microscópico na objetiva de 100x. Em seguida, efetuam-se sementeiras das amostras por técnica de esgotamento em quadrante nos meios CSB (sob aerobiose e anaerobiose, para obter esta última atmosfera os meios são colocados no interior de uma jarra GasPak na estufa), SDA (apenas na suspeita de infecção fúngica) e CHOC-PVS, sendo o restante da amostra inoculado em MLDA, de acordo com a Tabela 5.

As culturas são avaliadas às 24h de incubação e eventualmente 48h. O crescimento de colónias nos meios de cultura e o seu aspecto são comparados com o resultado do exame microscópico. Os resultados são valorizados de acordo com a correspondência do exame cultural com o que é observado na coloração Gram. Adicionalmente, se o MLDA estiver turvo realizam-se subculturas para novos meios sólidos em condições idênticas de incubação (Tabela 5). As colónias isoladas e valorizadas nos meios são identificadas e realiza-se o TSA.

5.1.4. Exsudado purulento superficial e profundo

As infeções das quais se colhe o pus podem ser de origem endógena ou exógena. Estas incluem não só as feridas de origem traumática como também as úlceras, queimaduras, mordidas de animais, lesões supurativas profundas, entre outras. O *Staphylococcus aureus* é a causa mais comum de desenvolvimento de infeções superficiais e abscessos. Porém, outras bactérias como *Enterobacteriaceae* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* podem provocar abscessos. No caso de infeções por mordida de animais, os principais microrganismos isolados são *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Pauteurella* spp. Enquanto para as queimaduras, os microrganismos mais isolados são o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. e *Enterobacter* spp. Além disso, as infeções fúngicas superficiais são causadas por diversas espécies, tais como fungos dermatófitos, *Candida* spp. e fungos filamentosos (*Aspergillus niger* e *Fusarium* spp.). [1]

As amostras de exsudado purulento são colhidas após uma técnica asséptica local para evitar a contaminação com a microbiota da pele. No caso do exsudado purulento superficial a amostra é colhida por aspiração, através de uma agulha e seringa, para um frasco estéril. Se não for possível aspirar o exsudado, a colheita é feita com uma zaragatoa e transportada em meio de Amies ou Stuart. No caso do exsudado purulento profundo a amostra é colhida por punção e aspiração, através de uma agulha e seringa, para o interior dum frasco estéril. Na suspeita de infecção por microrganismos anaeróbios, o conteúdo da seringa é colocado num meio de transporte semi-sólido com uma atmosfera de anaerobiose, denominado portagerm.

Primeiramente realiza-se o esfregão circular em lâmina das amostras e após secagem é feita a coloração de Gram. Procede-se também ao exame cultural por técnica de esgotamento em quadrante nos meios de cultura, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6. Exame microscópico e cultural de exsudado purulento superficial e profundo.

Exame Microscópico	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
Coloração Gram	CSB	Anaerobiose em jarra GasPak (caso de portagerm)	37°C (24 a 48h)
		O ₂	
	MCK, MSA, MLDA e SDA (casos de suspeita de infecção fúngica)	O ₂	
	CHOC-PVS	CO ₂ (5%)	

A gelose MacConkey (MCK) é um meio seletivo para o crescimento de bactérias de Gram negativo (por exemplo, *Enterobacteriaceae* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*) uma vez que possui na sua composição cristal violeta e ácidos biliares, que inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo (por exemplo, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.). É também um meio diferencial pois permite distinguir bactérias fermentadoras de lactose (colónias vermelhas) de não fermentadoras (colónias incolores) através do indicador de pH, vermelho neutro, que é responsável pela mudança de cor do meio sob acidificação fermentativa. [4]

O Manitol Salgado Agar (MSA) é um meio seletivo para isolamento de *Staphylococcus* spp. pois a sua elevada concentração de sal inibe o crescimento das bactérias de Gram negativo. Permite também diferenciar colónias de *Staphylococcus aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* spp., visto que apenas o *Staphylococcus aureus* fermenta o manitol contido no meio (colónias amarelas devido à acidificação do meio, indicada pelo vermelho de fenol). [4]

As culturas são observadas às 24h e eventualmente às 48h de incubação. Observa-se a presença de colónias nos meios seletivos (MCK – bactérias de Gram negativo; MSA – *Staphylococcus* spp.; SDA – fungos), e não seletivos (se há ou não hemólise em CSB e que tipo de hemólise). Adicionalmente para amostras em portagerm comparam-se os meios CSB, em aerobiose e anaerobiose, para determinar se estamos perante microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos. Os resultados são valorizados se houver correspondência do exame microscópico com o aspecto/tamanho das colónias e com o tipo de meio em que cresceram. Se o MLDA estiver turvo realizam-se subculturas em condições idênticas de incubação (Tabela 6). Após a valorização efetua-se a identificação das colónias isoladas e o TSA.

5.1.5. Exsudado faríngeo

O *Streptococcus pyogenes* (β -hemolítico) é um coco de Gram positivo e constitui a causa mais frequente da amigdalite e faringite bacteriana em crianças, sendo responsável por, aproximadamente, 10% a 15% dos casos de faringite microbiana em adultos. [10]

As amostras de exsudado faríngeo são colhidas em zaragatoa com meio de transporte de Amies ou Stuart. Primeiramente, realiza-se a sementeira em meio líquido MLDA e em CSB pela técnica de esgotamento em quadrante. Os meios são incubados durante 24 horas a 37°C, em atmosfera aerobiótica. Após as 24h, verifica-se se há crescimento em CSB de colónias β -hemolíticas características de *Streptococcus pyogenes*. Se o MLDA estiver turvo realiza-se uma subcultura em gelose CSB. As colónias valorizadas são identificadas e realiza-se o TSA.

Quando é solicitado, o SPC utiliza um *kit* comercializado, o DIMAS[®]Strep A, que consiste num teste rápido de fluxo lateral imunocromatográfico, em membrana, que possui anticorpos monoclonais imobilizados, na linha de teste e controlo, para a deteção de antígenos de *Streptococcus pyogenes* em amostras de exsudado faríngeo. A amostra é adicionada no poço da membrana e caso contenha os antígenos estes formam um complexo com anticorpos (marcados com partículas de látex coradas). O complexo migra por capilaridade pela membrana e liga-se aos anticorpos imobilizados na linha de teste, gerando uma banda corada. O aparecimento da linha colorida na zona de controlo verifica a exatidão do procedimento, pois se estiver ausente o resultado é considerado inconclusivo. Um resultado é dado como positivo se houver formação de uma banda colorida na zona teste e outra na zona controlo.

5.1.6. Exsudado nasal

Amostra é recolhida por zaragatoa em meio de transporte de Amies ou Stuart e é utilizada essencialmente para fins epidemiológicos na deteção de indivíduos portadores de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Assim que é recebida na subsecção, a amostra é inoculada por técnica de esgotamento no meio cromogéneo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSM). O meio é posteriormente incubado à temperatura de 35-37°C, em aerobiose, por um período de 18h a 24h. Posteriormente, os meios de cultura são observados em relação ao crescimento bacteriano e alteração da cor das colónias (Figura 2).



Figura 2. Colónias MRSA negativas e positivas no meio de cultura MRSM. (Fotografia tirada no SPC do HNM).

Este meio consiste numa base nutritiva rica combinada com diferentes peptonas, substratos cromogéneos, inibidores de crescimento de bactérias de Gram negativo, leveduras e

algumas bactérias de Gram positivo, bem como o antibiótico cefoxitina, ao qual o MRSA é também resistente. Assim, este meio promove o crescimento de bactérias de Gram positivo resistentes à cefoxitina, distinguidas entre si pela sua capacidade para hidrolisar os substratos cromogêneos presentes no meio. Bactérias MRSA hidrolisam um substrato específico cujo produto lhe confere uma cor rosa arroxeado. Porém, bactérias não MRSA utilizam outros substratos, gerando colónias azuis/verdes ou incolores caso não utilizem os substratos. [4]

5.1.7. Amostras do trato respiratório inferior

As amostras do trato respiratório inferior (laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos) são sobretudo a expetoração, aspirado traqueal, secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar, tendo estas um papel fundamental no diagnóstico bronquites (infecção dos brônquios), bronquiolites (infecção sobretudo viral a nível dos bronquíolos) e pneumonias (infecção dos alvéolos). O processamento é efetuado na câmara de fluxo laminar de nível II. Os principais agentes etiológicos bacterianos da bronquite são a *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Chlamydia pneumoniae*. Entretanto, a pneumonia bacteriana é geralmente causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* spp., bactérias anaeróbias e *Staphylococcus aureus*. Por fim, é de realçar que a pneumonia fúngica é geralmente associada a *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. [1, 11]

5.1.7.1. Expetoração e Aspirado traqueal

As amostras do trato respiratório inferior são recebidas na subsecção em frasco estéril. Primeiramente, avalia-se a qualidade das amostras de expetoração e aspirado traqueal pelo exame macroscópico, ou seja, verifica-se a presença restos alimentares contaminantes.

Seleciona-se a porção mais purulenta da amostra e realiza-se o esfregaço em lâmina por esmagamento. Para tal, coloca-se uma porção de amostra numa lâmina e pressiona-se com outra lâmina, deslizando as lâminas sobre si. Depois, a lâmina é corada pela técnica de Gram e observa-se ao microscópio na objetiva de ampliação 10x para avaliar a qualidade da amostra em termos da presença de células epiteliais e leucócitos, aplicando os critérios de Murray e Washington (Tabela 7). Deste modo, processa-se apenas as amostras que se enquadram nos grupos quatro e cinco, que são consideradas amostras do trato respiratório inferior e não apenas saliva. Estes critérios não deverão ser aplicados em doentes neutropénicos ou imunocomprometidos. Em seguida, observa-se na objetiva de ampliação 100x para detetar eventuais bactérias ou fungos presentes na amostra. Por fim, realiza-se a sementeira das

amostras de expetoração e aspirado traqueal por técnica de esgotamento em quadrante nos meios de cultura adequados (Tabela 8).

Tabela 7. Critérios de Murray e Washington.

Grupo	Células epiteliais por campo	Leucócitos por campo
1	25	<10
2	25	10-25
3	25	25
4	10-25	25
5	<10	25

Tabela 8. Exame macroscópico, microscópico e cultural de amostras do trato respiratório inferior.

Exame Macroscópico	Exame Microscópico	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
Presença de pus, sangue e restos alimentares	Coloração Gram	CSB, MCK, MSA, SDA (casos de suspeita de infecção fúngica)	O ₂	37°C (24 a 48h)
		HAEM	CO ₂ (5%)	

A gelose HAEM é uma variação da gelose chocolate (CHOC-PVS), uma vez que possui uma base nutritiva idêntica com fatores X (hemina) e V (NAD). Porém, ao contrário da gelose CHOC-PVS, a gelose HAEM contém antibióticos na sua composição, como a bacitracina, o que a torna um meio seletivo para o crescimento de *Haemophilus* spp., sendo o seu uso recomendado para a análise destas amostras com uma microbiota complexa associada. [4]

5.1.7.2. Secreções brônquicas e Lavado bronco-alveolar

No caso das amostras de secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar, homogeneiza-se a amostra, centrifuga-se e ressuspende-se o precipitado. O lavado bronco-alveolar deve ser processado de imediato. Em seguida, realiza-se o esfregaço em lâmina por esmagamento e após a coloração de Gram observa-se a lâmina ao microscópio, na objetiva de ampliação 100x, para detetar bactérias ou fungos na amostra. Por fim, realiza-se a sementeira das amostras por técnica de esgotamento em quadrante nos meios de cultura (Tabela 8).

As culturas são avaliadas às 24h e 48h de incubação, sendo consideradas estéreis se negativas após este período. Após, avalia-se o tipo de hemólise no meio CSB e o aspecto das colónias nos meios de crescimento seletivos, sendo valorizados de acordo a correspondência com a coloração de Gram. Em seguida, as colónias são identificadas e realiza-se o TSA.

5.1.8. Fezes

A coprocultura (cultura microbiológica de fezes) auxilia o diagnóstico e determinação da etiologia de patologias gastrointestinais, através do isolamento de organismos patogênicos presentes nas fezes. A gastroenterite corresponde a uma inflamação do trato gastrointestinal, sendo acompanhada de sintomas como diarreia, vômitos, náuseas, dor abdominal e ocasionalmente febre. As gastroenterites podem ser causadas por bactérias, vírus ou parasitas. Quando é solicitada uma coprocultura de rotina são procurados agentes etiológicos bacterianos, tais como *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli*, incluindo a *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 (EHEC).

A *Shigella* spp. (*Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* e *Shigella boydii*) é uma bactéria de Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É transmitida sobretudo por via fecal-oral, sendo responsável por causar disenteria bacilar, um tipo de gastroenterite associada a fezes com sangue e muco. Por outro lado, a salmonelose é uma gastroenterite causada por *Salmonella* spp., também pertencente à família *Enterobacteriaceae* e é transmitida sobretudo por via fecal-oral ou alimentos contaminados. Existem mais de 2200 serotipos segundo os antígenos somáticos (O) e flagelares (H), sendo a *Salmonella enterica* de vários serotipos os principais agentes de gastroenterite, com exceção da *Salmonella enterica* serotipo Typhi e Paratyphi que causam a febre tifoide. [12]

A infecção por EHEC pode provocar uma gastroenterite não complicada, uma colite hemorrágica (cólicas abdominais e diarreia sanguinolenta) ou uma síndrome hemolítica-urêmica (SHU). Produz uma toxina semelhante à toxina Shiga (STEC) e é transmitida por alimentos ou água contaminados, mas a disseminação fecal-oral também é possível. [12]

Adicionalmente, a maioria das gastroenterites em humanos por *Campylobacter* spp. são causadas por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. A transmissão ocorre por via fecal-oral, consumo de carne mal cozinhada, água contaminada ou leite não pasteurizado. Para além dos sintomas normalmente associados a gastroenterites, o *Campylobacter* spp. é também responsável pela presença de sangue e pus nas fezes. [12]

Por outro lado, o *Clostridium difficile* é um bacilo esporulado de Gram negativo anaeróbio, frequentemente transmitido nosocomialmente através da ingestão de esporos. Estes esporos possuem a capacidade de resistir à digestão, tornando-se vegetativos no cólon até alterações na microbiota intestinal promoverem a sua proliferação. É o agente etiológico da colite pseudomembrana, associada à administração de antibióticos, patologia caracterizada por nódulos pseudomembranosos nas zonas distal e sigmoide do cólon e reto. Certas estirpes produzem uma enterotoxina (Toxina A) e uma citotoxina (Toxina B). [12]

Entretanto, as gastroenterites virais são transmitidas por via fecal-oral e afetam maioritariamente crianças. Os principais vírus causadores de gastroenterites são: Caliciviridae (Norwalk vírus e Norovírus), Rotavírus e Adenovírus. Os rotavírus e os adenovírus são, respetivamente, os primeiros e os segundos agentes etiológicos mais comuns, principalmente na infância precoce. [12]

Inicialmente, as amostras de fezes são analisadas macroscopicamente em termos de consistência, cor, presença de sangue, muco e pus. Amostras de fezes mais sólidas são homogeneizadas em 1mL de soro fisiológico no vórtex. Posteriormente, é realizada a inoculação da amostra nos meios CSB, *Salmonella Shigella* (SS), caldo selenito, MCK, sorbitol MacConkey agar (SMAC) e *Campylobacter* agar (CAMPY), de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9. Exame macroscópico e cultural de amostras de fezes.

Exame Macroscópico	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
Consistência, cor, presença de sangue, muco e pus	CSB, SS, Caldo Selenito, MCL e SMAC	O ₂	37°C (24h)
	CAMPY	5% O ₂	42°C (48-72h)

O meio SS é seletivo e de diferencial para detetar *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em fezes. É um meio seletivo pois inibe o crescimento de microrganismos de Gram positivo pela presença de sais biliares e de corantes. É um meio diferencial, pois permite diferenciar colónias fermentadoras de lactose (colónias rosa) de não fermentadoras (colónias incolores) pelo seu indicador de pH, vermelho neutro. Adicionalmente possui tiosulfato de sódio e citrato férrico que evidenciam colónias capazes de reduzir o tiosulfato e produzir sulfureto de hidrogénio (colónias com centro negro). Assim, as colónias de *Shigella* spp. são incolores, enquanto as colónias de *Salmonella* spp. são incolores, porém com centro negro (Figura 3A). [4]

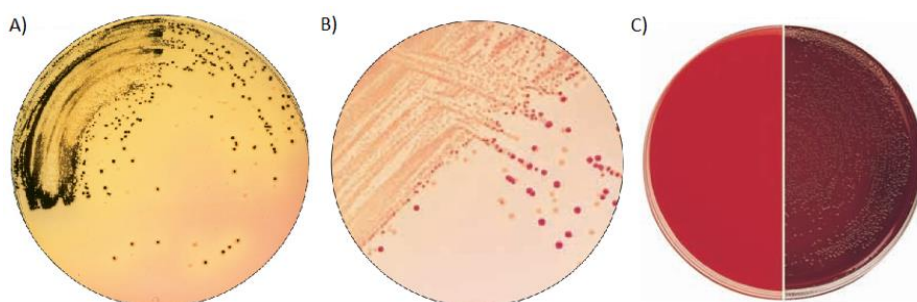


Figura 3. A) Meio SS com colónias incolores (*Shigella* spp.) e de centro negro (*Salmonella* spp.); B) Meio SMAC com colónias incolores (EHEC) e rosas (*Escherichia coli*); C) Meio CAMPY cujo lado direito foi inoculado com *Campylobacter jejuni*. [4]

Para enriquecimento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em amostras de fezes é utilizado o caldo selenito. Este meio possui selenito que inibe a maioria das *Enterobacteriaceae* e cocos de Gram positivo. O caldo não deve ser incubado por mais de 24 horas. Caso não haja

crescimento no meio SS após 24h, utiliza-se uma porção deste caldo para realizar a subcultura para um outro meio SS, que é incubado a 37°C em aerobiose por 24h [4]. Por fim, as colónias são valorizadas de acordo com a informação clínica e aspecto, de modo a terem seguimento para a identificação por MALDI-TOF-MS e TSA por VITEK-2.

O meio SMAC destina-se ao isolamento e diferenciação de EHEC, sendo uma variação do meio MCK, pois tem na sua composição sorbitol em vez de lactose. Em MCK, a EHEC é indistinguível de outras *Escherichia coli*, visto que são todas fermentadoras de lactose (colónias rosas). Porém, ao contrário de outras *Escherichia coli*, a EHEC não fermenta o sorbitol e gera colónias transparentes no meio SMAC (Figura 3B), permitindo assim o seu isolamento e posterior identificação por MALDI-TOF-MS e TSA por VITEK-2. [4]

O meio CAMPY é seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de fezes, sendo uma variação da gelose CSB com antibióticos e antifúngicos que inibem a maioria dos contaminantes bacterianos e fúngicos. O isolamento de *Campylobacter* spp. depende, além disso, de um ambiente microaerofílico e de uma temperatura de incubação de 42°C. As colónias de *Campylobacter* spp. são pequenas e acinzentadas, e por vezes estendem-se ao longo das estrias de inoculação (Figura 3C) [4]. Finalmente, procede-se à identificação por MALDI-TOF-MS, tendo em conta a história clínica e aspecto das colónias.

O SPC utiliza o *Teclab C. diff Quick Check Complete*, um imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral, em membrana de nitrocelulose, com anticorpos imobilizados, nas zonas de teste e controlo, para a deteção simultânea do antígeno glutamato desidrogenase e das toxinas A e B do *Clostridium difficile* em amostras fecais não moldadas. A deteção do glutamato desidrogenase constitui um indicador da presença de *Clostridium difficile*. A deteção das toxinas A e B indica a presença de uma estirpe toxigénica [13]. O teste possui anticorpos específicos marcados com partículas de látex coradas que, em contacto com os antígenos e/ou toxinas presentes na amostra, formam complexos. Os complexos migram por capilaridade e ligam-se aos anticorpos imobilizados na zona de teste, formando até três bandas coloridas (linha de antígeno, toxina A e toxina B, respetivamente), bem como uma banda na zona de controlo. A subseção procede a este ensaio quando solicitado, se na requisição constar um diagnóstico de colite pseudomembranosa e em doentes maiores de 65 anos com diarreia grave.

Por fim, o *Imunoquick Adenovirus-Rotavirus-Norovirus Combo* é um imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral utilizado no SPC para a deteção simultânea de antígenos de Rotavírus, Adenovírus e Norovírus em amostras de fezes. Em casos de coinfeção viral haverá, para além da banda colorida na zona de controlo, até um máximo de três bandas na zona de teste, cada uma respetiva ao vírus detetado por este teste.

5.2. Subsecção Bacteriologia 2: análises bacteriológicas, micológicas e parasitológicas

5.2.1. Urina

A urina é uma amostra frequentemente utilizada para o diagnóstico das infeções do trato urinário (ITU). As ITU ocorrem mais frequentemente em mulheres por motivos anatómicos, visto que a uretra é mais curta que no sexo masculino e mais próxima ao ânus. Outros fatores de risco de ITU são a idade, atividade sexual, diabetes, antibioterapia ou imunossupressão prolongada (no caso de *Candida* spp. e outros fungos), transplante renal, uso de cateter urinário, anormalidades anatómicas que interferem no fluxo de urina e predisposição genética. [1, 14]

As ITU podem ocorrer pela via ascendente (da uretra e bexiga para os ureteres e rim), descendente (bacteriémia que progride a pielonefrite) ou linfática (aumento de pressão na bexiga pode causar um fluxo linfático direcionado ao rim). A via ascendente constitui o percurso mais comum de infeção e é causada frequentemente por bacilos de Gram negativo, em particular por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre os cocos de Gram positivo, os principais agentes etiológicos são o *Enterococcus* spp., *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae*. Adicionalmente, as ITU por via hematogénica são causadas por *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. [1, 14]

As amostras de urina são enviadas imediatamente ao SPC para evitar a contaminação e crescimento microbiano, que gera contagens falsamente elevadas, podendo se encontrar em:

- Uriline (Figura 4) – meio de transporte e cultura ideal para serviços afastados. Contém dois meios de cultura: CLED (*Cystine Lactose Electrolyte-Deficient*) e MacConkey (MCK);
- Monovette 10mL com ácido bórico (verde) – contém ácido bórico que estabiliza o crescimento de microrganismos até 48h à temperatura ambiente, sendo utilizado para amostras de serviços afastados; Monovette 10mL sem estabilizador (amarela), sendo utilizada principalmente para amostras colhidas no próprio SPC.

A gelose de CLED do Uriline é um meio não seletivo e diferencial, pois contém na sua composição lactose e um indicador de pH, o azul de bromotimol, que confere cor amarela perante acidificação fermentativa. Bactérias fermentadoras de lactose apresentam-se como colónias amarelas e não fermentadoras como colónias verdes, azuis ou incolores. O meio também possui cistina que permite o crescimento de “colónias anãs” de coliformes. [4]



Figura 4. Meio Uriline com geloses MacConkey e CLED em faces opostas. (Fotografia tirada no SPC do HNM).

O déficit em eletrólitos inibe o efeito *swarming* do *Proteus* spp. A gelose MCK do Uriline permite um crescimento seletivo de bactérias de Gram negativo e diferencia fermentadores de lactose (colónias vermelhas) de não fermentadores (colónias incolores). [4]

As amostras de urina são incubadas em meios Uriline durante 24h a 37°C, em aerobiose, sendo recebidas no SPC e juntamente com uma monovette de 10mL de urina. Primeiramente, é realizado o exame citológico do sedimento urinário e, para tal, centrifuga-se os 10mL de urina a 1500rpm durante 10 minutos. Em seguida, observa-se na objetiva de 40x, em pelo menos 10 campos diferentes, a presença de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais, bactérias, leveduras, pseudohifas (*Candida albicans*) e parasitas. Os leucócitos e eritrócitos são quantificados, sendo indicadores de ITU (Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros de quantificação do exame citológico do sedimento urinário.

	Leucócitos	Eritrócitos
Raros	<5 por campo	<4 por campo
Alguns	5-20 por campo	4-20 por campo
Muitos	>20 por campo	>20 por campo

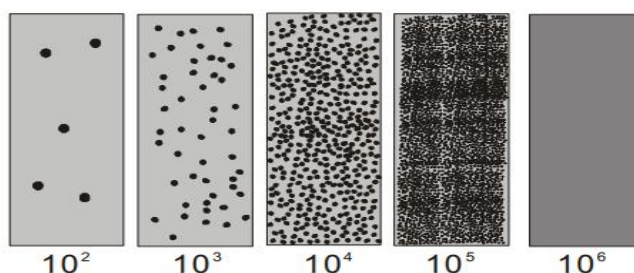


Figura 5. Representação do crescimento microbiológico no meio CLED e do resultado correspondente em UFC/mL. [15]

Posteriormente, observa-se a densidade das colónias no meio CLED do Uriline e determina-se o número de unidades formadoras de colónias (UFC) por mL, por comparação com a Figura 5. As amostras são valorizadas da seguinte forma:

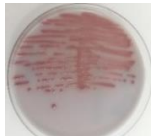

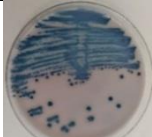
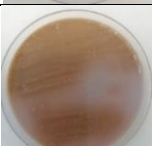
- Cultura pura com contagem superior a 10⁵ UFC/mL, regista-se a contagem e procede-se à identificação por MALDI-TOF-MS e ao TSA por VITEK-2;
- Cultura pura com contagem entre 10⁴ e 10⁵ UFC/mL. Neste caso considera-se que se trata de contaminação uretral ou vaginal, exceto se o exame citológico do sedimento urinário for sugestivo de ITU (presença de alguns ou muitos leucócitos, eritrócitos e microrganismos), se houver sintomatologia e histórico prévio de ITU, em utentes com cateter urinário, indivíduos recetores de transplante renal ou em situações de antibioterapia prolongada. Nestes casos procede-se à coloração de Gram do sedimento

urinário para avaliar a qualidade da amostra (considera-se que há contaminação quando há prevalência de células epiteliais e/ou *Lactobacillus* spp.), realiza-se a identificação e o TSA;

- Cultura com duas colónias diferentes, em que pelo menos uma delas tem uma contagem acima de 10^4 UFC/mL. Proceder-se à coloração de Gram do sedimento para avaliar a qualidade da amostra e existência de predominância entre os dois microrganismos. Se a amostra não apresentar indícios de contaminação realiza-se uma subcultura em Uriselect4 para isolar os microrganismos, bem como a identificação e TSA;
- Cultura com uma ou mais colónias com contagens abaixo de 10^4 UFC/mL. Geralmente considera-se o resultado negativo por contaminação uretral ou vaginal, principalmente se a amostra foi obtida por saco coletor. Se a amostra foi obtida por punção supra-pública procede-se subcultura em Uriselect4 e posterior identificação TSA;
- Cultura com três ou mais colónias. Solicitar uma nova amostra, exceto em amostras obtidas por punção supra-pública, situações em que se procede à subcultura em Uriselect4 e posterior identificação e TSA.

Depois de se observar a gelose CLED do Uriline observa-se a gelose MCK. Se houver crescimento em ambos os meios trata-se de uma bactéria de Gram negativa. Se não houver crescimento na gelose MCK trata-se de uma bactéria de Gram positivo ou fungo.

Tabela II. Análise macroscópica de colónias de agentes patogénicos em meio Uriselect4. (Fotografias tiradas no SPC do HNM).

Microrganismo	Cor das colónias pós 24h de incubação	β -galactosidade	β -glucosidade	Indol	TDA
<i>Escherichia coli</i>		+	-	+	-
<i>Enterococcus</i> spp.		-	+	-	-
<i>Klebsiella</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Serratia</i> spp.		+	+	-	-
<i>Proteus</i> spp. <i>Providencia</i> spp. <i>Morganella</i> spp.		-	-	+	+

Por outro lado, quando as urinas são recebidas unicamente em monovette são homogeneizadas por inversão e semeadas em Uriselect4 com uma ansa calibrada de 10 µL. Posteriormente, o meio é incubado durante 24h a 37°C, em atmosfera de aerobiose. O Uriselect4 é um meio não seletivo e diferencial, que possui uma base nutritiva, dois substratos cromogêneos para a detecção de enzimas bacterianas, respetivamente a β-galactosidade e β-glucosidade, bem como triptofano para a detecção da actividade da triptofanase e de triptofano desaminase (TDA) [16]. O aspecto das colónias resulta da presença ou ausência de clivagem enzimática dos substratos cromogêneos e na atividade da triptofanase e TDA (Tabela 11).

Após o período de incubação do Uriselect4 observa-se a cor e densidade de colónias, determinando-se ainda o UFC/mL. Paralelamente, é realizado o exame citológico do sedimento urinário. A valorização dos resultados do Uriselect4 obedece aos mesmos critérios empregues no Uriline. Caso seja necessário realizar subculturas para isolar microrganismos estas são feitas, de acordo com a cor da colónia em Uriselect4 e coloração de Gram, em meios CSB (cocos de Gram positivo como *Enterococcus* spp.), MCK (bactérias de Gram negativo como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp.) e meio Candida (CAN2).

O meio CAN2 é seletivo para o crescimento de leveduras (possui uma mistura de antibióticos para inibir o crescimento de bactérias) e contém substratos cromogénicos para a diferenciação de espécies de leveduras. A hidrólise do substrato cromogénico de hexosaminidase origina a coloração azul das colónias de *Candida albicans* (Figura 6), enquanto a hidrólise de um segundo substrato origina colónias rosa (*Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* e *Candida kefyr*) [17]. Por fim, procede-se à identificação dos microrganismos isolados por MALDI-TOF-MS e ao TSA por VITEK-2.

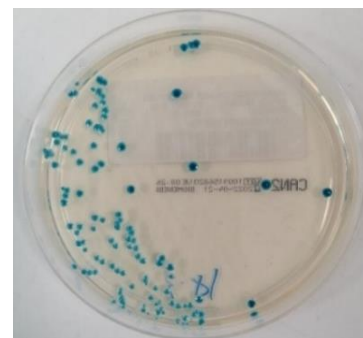


Figura 6. Colónias de *Candida albicans* em gelose CAN2. (Fotografia tirada no SPC do HNM).

5.2.2. Exsudado vaginal e uretral

As infeções geniturinárias podem ser causadas por microrganismos patogénicos de transmissão sexual (por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae* e o parasita *Trichomonas vaginalis*) ou por alterações na microbiota genital (vaginose bacteriana ou vaginite por *Candida* spp.). [18]

A microbiota vaginal é composta predominantemente por *Lactobacillus* spp., mas também pode apresentar *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., leveduras e anaeróbios. Muitas mulheres grávidas são portadoras de *Streptococcus agalactiae* (β-hemolítico em meio CSB) que pode causar infeções em recém-nascidos, tais como meningite

e bacteriemia neonatal. Assim, o exsudado vaginal é colhido por zaragatoa entre a 35^a e a 37^a semana de gestação para avaliar a necessidade de antibioterapia durante o parto. [1, 18]

A vaginose bacteriana é caracterizada pela redução de *Lactobacillus* spp., microbiota polimicrobiana, ausência de leucócitos e presença de *clue cells* (células epiteliais rodeadas de bactérias). Cerca de 80% a 90% dos casos de vaginite por *Candida* spp. são causadas pela proliferação anormal de *Candida albicans*, levedura produtora de pseudohifas. [1, 18]

Tabela 12. Exame microscópico e cultural de exsudado vaginal e uretral.

Exame Microscópico	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
Fresco e Coloração Gram	CSB, Gelose Granada (apenas exsudado vaginal), MSA (apenas exsudado uretral) e CAN2	O ₂	37°C (24-48h)
	CHOC-PVS	CO ₂ (5%)	

As amostras de exsudado vaginal e uretral são recebidas em zaragatoas, em meio de transporte Stuart, e processadas na subsecção de acordo com a Tabela 12. Primeiramente realiza-se um esfregaço circular da amostra numa lâmina com a zaragatoa e observa-se a fresco na objetiva de 40x para detetar células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, bactérias, leveduras e pseudohifas (características de *Candida albicans*).

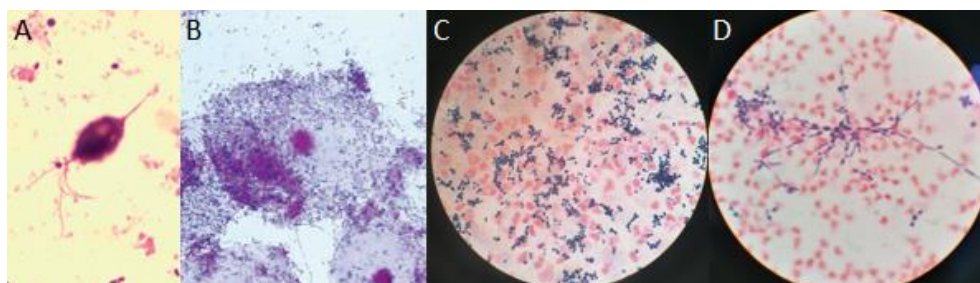


Figura 7. Coloração de Gram de exsudado vaginal com: (A) trofozoíto de *Trichomonas vaginalis* [19]; (B) *clue cells* [19]; (C) formas leveduriformes coradas a roxo e (D) pseudohifas coradas a roxo. (C e D – Fotografias tiradas no SPC do HNM).

É também realizado um segundo esfregaço da amostra para ser corado pelo *Aerospray* Gram. Observa-se na objetiva de 100x, além dos elementos anteriormente referidos, a presença do trofozoíto de *Trichomonas vaginalis* e a microbiota genital. Em situação normal existe predominância de *Lactobacillus* spp. e ausência de *clue cells* (Figura 7).

De seguida as amostras são semeadas por técnica de esgotamento em quadrante na gelose de CSB (direcionado para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, β-hemolítico), gelose MSA para o isolamento e diferenciação de *Staphylococcus* spp. no exsudado uretral, CHOC-PVS para o isolamento do diplococos de Gram negativo *Neisseria gonorrhoeae*, gelose CAN2

para o isolamento e diferenciação de *Candida* spp. e gelose Granada para a diferenciação de *Streptococcus agalactiae* no exsudado vaginal de mulheres grávidas entre as 35 e 37 semanas de gestação. Na gelose Granada o *Streptococcus agalactiae* produz colónias com um pigmento vermelho alaranjado, enquanto outros microrganismos capazes de crescer neste meio não produzem tal pigmento. Por fim, realiza-se a identificação definitiva das colónias isoladas nestes meios por MALDI-TOF-MS e efetua-se o TSA por VITEK-2.

5.3. Subsecção Micobacteriologia

Na secção de Microbiologia realiza-se também a pesquisa de micobactérias, nomeadamente pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), tais como o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*, que são os agentes patogénicos estritos que causam tuberculose. Embora existam outras espécies de *Mycobacterium*, a maioria são não patogénicas ou patógenos oportunistas. A tuberculose geralmente afeta essencialmente os pulmões e as vias respiratórias inferiores, mas pode ter um envolvimento extrapulmonar em indivíduos imunocomprometidos. Estes microrganismos são bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), portanto não podem ser corados pela técnica de Gram, mas sim por Ziehl-Neelsen (ver Anexo 1). [20]

A transmissão da tuberculose ocorre por inalação de gotículas e aerossóis infecciosos, bem como pelo processamento de amostras em laboratório. Tendo isto em consideração, a manipulação das amostras é efetuada com equipamentos de proteção individual, como máscaras de proteção FFP3 (*Filtering Face Pieces 3*), numa câmara de fluxo laminar nível II que está situada dentro de uma sala isolada com pressão negativa.

As amostras mais comuns na Micobacteriologia são as do trato respiratório inferior e líquido pleural. A emissão de micobactérias não é contínua, por isso são necessárias três amostras de expetoração colhidas em dias consecutivos pela manhã, uma vez que é mais provável conterem BAAR pela acumulação durante a noite. Outras amostras extrapulmonares também são analisadas, tais como: o líquido peritoneal, sinovial, urina (sedimento urinário ressuspendido), sangue e LCR. No caso de urinas, só são aceites amostras que tiverem muitos ou alguns leucócitos no sedimento urinário e sem bactérias ou fungos patogénicos.

5.3.1. Análise das amostras de rotina

Primeiramente, realiza-se o exame microscópico pela técnica de Ziehl-Neelsen. Esta técnica, apesar de ser útil para o diagnóstico presuntivo não permite distinguir micobactérias do CMT de outras micobactérias e possui uma baixa sensibilidade, uma vez que são

necessários 10^4 bacilos por mL de amostra para se poder observar os BAAR. Portanto, os resultados negativos ou positivos são sempre confirmados pelo exame cultural [21]. Contudo, para se considerar que um exame microscópico é positivo não basta detetar BAAR, é necessário que sejam quantificados pelo menos 10 BAAR em 100 campos de observação. Caso se quantifique um a nove BAAR considera-se o exame duvidoso e pede-se uma nova amostra.

As amostras são processadas antes do exame cultural em quatro etapas: homogeneização com soro fisiológico, descontaminação com uma solução N-acetil-L-cisteína (agente mucolítico) com hidróxido de sódio 2% (pH alcalino), neutralização de pH com tampão fosfato e concentração por centrifugação, com exceção do sangue e LCR que são inoculadas nos meios diretamente. As micobactérias toleram brevemente o pH alcalino, porém uma descontaminação prolongada pode eliminá-las da amostra e provocar resultados culturais falsos negativos, portanto esta etapa não pode durar mais de 20 minutos [19]. Após este tempo, sucede-se a etapa de neutralização do pH alcalino com tampão fosfato.

Depois do processamento, o ressuspendido é semeado por inundação em meio sólido Löwenstein–Jensen e no meio líquido MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), diretamente no caso do sangue e LCR. Porém, em outras amostras deve-se adicionar previamente ao meio MGIT um suplemento de antibióticos para reduzir possíveis contaminações.

O meio Löwenstein–Jensen possui uma composição nutritiva à base de ovo e verde de malaquite (agente inibidor) que garante uma cultura pura pois impede a contaminação do meio por outros microrganismos [4]. Os meios Löwenstein–Jensen são incubados, em aerobiose a 35°C , deitados e com a tampa meia desenroscada durante os primeiros sete dias para que a amostra se mantenha distribuída pelo meio. Ao fim de sete dias aperta-se a tampa e coloca-se o meio na vertical, sendo examinados semanalmente até à sétima semana de incubação.

Os frascos de meio líquido MGIT contêm um composto fluorescente sensível à presença do oxigénio e são monitorizados pelo aparelho BACTEC MGIT 960 BD a cada 60 minutos durante 42 dias, de acordo com um princípio semelhante ao do BACTEC 9240 BD (ver página 7). Porém no BACTEC MGIT 960 BD é o consumo de oxigénio resultante do crescimento de microrganismos que causa a emissão da fluorescência. O aparelho indica a presença de micobactérias e quantifica o número de colónias no meio líquido MGIT.

Um exame cultural positivo (há crescimento no meio sólido e colónias suspensas no meio líquido MGIT) com um exame microscópico negativo pode significar que ocorreu contaminação da amostra com um microrganismo que não seja micobactéria ou devido à baixa sensibilidade do exame microscópico. Se o exame cultural for negativo e o microscópico positivo, deve-se possivelmente à descontaminação prolongada com eliminação de BAAR.

Quando o exame cultural é positivo (Figura 8) realiza-se um teste rápido imunocromatográfico (*SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid*) que possui uma membrana revestida na linha de teste com anticorpos específicos para a pesquisa do antígeno MPT64, característico de micobactérias do CMT. Um resultado positivo neste teste rápido indica que a amostra possui este tipo de micobactérias, porém é necessário ter em consideração os exames cultural e microscópico anteriores para se confirmar as características típicas das micobactéria do CMT.

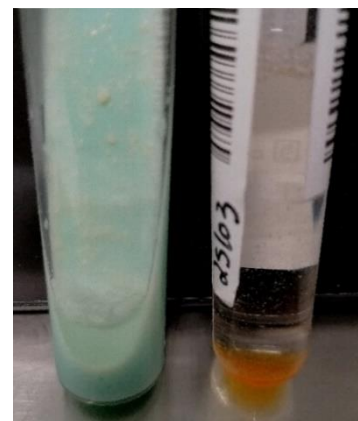


Figura 8. Exame cultural positivo com colónias de micobactérias CMT. Esquerda – meio Löwenstein-Jensen. Direita – meio MGIT. (Fotografia tirada no SPC do HNM).

Atenta-se que culturas em Löwenstein-Jensen com crescimento de colónias em menos de sete dias corresponde a micobactérias atípicas, ou seja, não pertencem ao CMT. A alteração de cor do meio de Löwenstein-Jensen com colónias de aparência de “couve-flor” são características do CMT (Figura 8), juntamente com a presença de BAAR agrupados em “cordas” no exame microscópico. Após, realiza-se o TSA a partir do meio MGIT positivo.

Por outro lado, quando o exame cultural é positivo, mas o teste rápido imunocromatográfico (*SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid*) é negativo suspeita-se de uma micobactéria atípica, principalmente se não tiver características de micobactérias do CMT, anteriormente referidas nos exames cultural e microscópico. Nesta situação realiza-se a sementeira do meio líquido MGIT, com uma ansa por técnica de esgotamento em quadrante, num meio CHOC-PVS, que é posteriormente incubado a 37°C, durante 24 a 48h, numa atmosfera 5% CO₂. Se houver crescimento trata-se de contaminação com um microrganismo que não é uma micobactéria e pede-se uma nova amostra. Se não houver crescimento no meio CHOC-PVS há uma elevada possibilidade de se tratar de uma micobactéria atípica.

É de referir que, em alguns casos com suspeita de tuberculose ou em utentes infetados com o vírus de imunodeficiência humana (VIH), com uma doença pulmonar obstrutiva crónica ou neoplasia, realiza-se o RT-PCR pelo equipamento Hain *FluoroType* MTB para fazer a determinação rápida de DNA do CMT na amostra. O sistema integra a extração de ácidos nucleicos das amostras, ciclos de amplificação e deteção de sequências-alvo. Após a extração, os ácidos nucleicos emparelham com um sonda molecular complementar à sequência de DNA do CMT. A sonda está complexada nas extremidades a um fluoróforo e um *quencher*. Adicionalmente existe uma segunda sonda molecular complementar a uma sequência de DNA introduzida como controlo interno. Durante as fases de emparelhamento de cada ciclo de amplificação, o fluoróforo é afastado do *quencher* e a fluorescência é detetada. Os resultados

são gerados num gráfico de unidades de fluorescência por temperatura de *melting* (temperatura na qual metade das cadeias de DNA estão desemparelhadas). Uma sequência de DNA do CMT tem uma temperatura de *melting* característica de 70,5°C, enquanto a temperatura de *melting* do controlo é de 60°C. [22]

5.4. Métodos de identificação manual

As colónias isoladas, após a incubação em meios de cultura adequados, são valorizadas consoante a clínica do utente e correspondência entre os exames microscópico e cultural.

A identificação consiste inicialmente no registo dos resultados do exame microscópico pela coloração de Gram ou Ziehl-Neelsen, em termos de morfologia e agrupamento das bactérias, bem como da sua afinidade para os corantes (bactérias de Gram positivo ou negativo, BAAR ou não BAAR). Em relação aos fungos regista-se a presença de leveduras de Gram positivo (*Candida albicans* produz também pseudohifas). Após, avalia-se o crescimento dos microrganismos nos diferentes meios de cultura, seletivos e não seletivos, de acordo com o tempo e condições de incubação para atmosfera, humidade e temperatura (por exemplo, o *Campylobacter* spp. só cresce em atmosfera 5%O₂ a 42°C e os anaeróbios estritos só crescem nas jarras de anaerobiose GasPak). Observam-se também as características macroscópicas das colónias, tais como: forma (por exemplo, micobactérias do CMT com colónias “couve-flor”), dimensão (colónias de Gram negativo são geralmente maiores), elevação, margem da colónia (*Proteus* spp. gera efeito *swarming*), superfície, consistência (*Klebsiella* spp. é mucoide), produção de pigmento (*Pseudomonas aeruginosa* produz piocianinas e pioverdinas que lhe confere um aspecto esverdeado), capacidade de fermentação de açúcares evidenciada pela mudança de cor do meio, produção de sulfureto de hidrogénio, metabolismo de substratos cromogéneos evidenciado pela cor da colónia, bem como a presença e tipo de hemólise.

Só depois de realizados os exames microscópicos e culturais é que se procede às provas de identificação manuais metabólicas (oxidase, catalase e coagulase), principalmente na suspeita de *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp. e *Campylobacter* spp.

5.4.1. Teste de oxidase

O teste de oxidase é baseado na produção intracelular, pelas bactérias, de citocromo-oxidase. Esta enzima atua na cadeia transportadora de eletrões da respiração celular, em particular, catalisa a conversão do citocromo c reduzido em citocromo c oxidado e eletrões. O teste utiliza um corante (tetrametil-p-fenilenodiamina), impregnado numa tira de papel de filtro, que no contacto com uma colónia de bactérias produtoras de citocromo-oxidase atua

como dador de eletrões para o composto citocromo c oxidado, gerando assim um produto de cor púrpura (reação oxidase positiva). A reação deve ser observada dentro de um minuto e permite distinguir as bactérias oxidase positiva (por exemplo, a *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp. e *Campylobacter* spp.) de bactérias oxidase negativa, como as *Enterobacteriaceae* spp. (por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp.). [23]

5.4.2. Teste da catalase

A catalase é uma enzima produzida por certas bactérias sendo responsável por converter o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, libertado sob a forma de bolhas. Esta é uma prova utilizada para diferenciar o *Staphylococcus* spp. de bactérias como o *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., visto que o primeiro produz esta enzima (catalase positivo). No SPC esta prova não é realizada com peróxido de hidrogénio, mas sim por uma solução (*ID Color Catalase*), que possui propriedades similares. Em termos práticos, deposita-se uma gota de *ID Color Catalase* diretamente na colónia e observar-se se há produção de bolhas de gás. O teste é positivo para catalase se ocorrer libertação de bolhas de oxigénio. [23]

5.4.3. Teste da coagulase

Se o teste da catalase for positivo para as colónias suspeitas de *Staphylococcus* spp., deve ser realizado o teste *PASTOREX STAPH-PLUS* para se diferenciar as bactérias coagulase positivo (*Staphylococcus aureus*) de bactérias coagulase negativo (*Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*). O *PASTOREX STAPH-PLUS* é um teste de aglutinação para a deteção simultânea de coagulase ligada, proteína A e polissacarídeo capsular característicos de *Staphylococcus aureus*. O reagente contém: partículas de látex revestidas com fibrinogénio que reagem com a coagulase ligada; partículas de látex revestidas com IgG que reagem com a proteína A e partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais que reagem com os polissacáridos capsulares, formando assim uma aglutinação visível (teste positivo). Em termos práticos, coloca-se uma gota de reagente num pedaço de cartão de aglutinação, depois com o auxílio de um palito retira-se a colónia e homogeneiza-se lentamente a mistura. A leitura deve ser feita durante os primeiros 30 segundos de reação e verifica-se se há aglutinação. [24]

5.5. Métodos automáticos de identificação de microrganismos

Depois de efetuada a identificação manual de bactérias e fungos é realizada a identificação definitiva por métodos automáticos como MALDI-TOF-MS. Este método permite fazer a identificação definitiva diretamente a partir de colónias isoladas em meios de cultura.

O aparelho MALDI-TOF-MS *Biotyper* é composto essencialmente por três componentes: câmara de ionização de amostra, analisador de massa por tempo de voo e um detetor de partículas. É colhida uma colónia isolada num determinado meio de cultura e colocada numa placa juntamente com uma matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – CHCA). Seguidamente, a placa que contém a mistura de amostra com matriz (e ácido fórmico no caso dos fungos) é inserida na câmara de ionização, sob vácuo, na qual a mistura é pulsada por laser. A irradiação por laser gera uma excitação vibratória da matriz e conseqüente a dessorção de moléculas da amostra e matriz. Após a dessorção, as moléculas de matriz transferem protões para as moléculas de amostra, resultando em iões com carga positiva no estado gasoso. Estes iões são acelerados em contacto com um campo elétrico na câmara de ionização, segundo uma velocidade que depende da relação massa/carga do ião. Em seguida, os iões são separados no analisador e o “tempo de voo” de cada ião é registado no detetor. Com base no tempo de voo, é determinada a relação massa/carga de cada ião gerado, construindo-se assim o espectro de massa da amostra que é comparado com uma base de dados de microrganismos clinicamente relevantes. [25]

A identificação definitiva de espécies de bactérias e fungos por MALDI-TOF-MS *Biotyper* é validada de acordo com a correspondência da espécie com os resultados da identificação manual, tipo de amostra, bem como pela situação clínica, pois que pode ocorrer crescimento de agentes não patogénicos pertencentes à microbiota humana.

5.6. Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Quando um utente apresenta uma doença causada por um microrganismo infeccioso, em muitos casos saber quais as melhores opções de tratamento requer mais do que determinar a identificação da espécie. Tendo isto em consideração, recorre-se ao TSA que fornece o perfil preliminar de sensibilidade e de resistência de microrganismos aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infeções, sendo assim fundamental para a escolha de terapias mais adequadas, bem como para implementar medidas de prevenção de propagação dos agentes patogénicos multirresistentes.

O VITEK-2 permite realizar o TSA automático após a identificação definitiva da espécie do fungo ou bactéria por MALDI-TOF-MS. Baseia-se na técnica da concentração mínima inibitória (CMI) através de cartas de TSA, tendo cada carta diversos poços de teste com meio de cultura sob diluições sucessivas de agente antimicrobiano. A carta TSA contém também um poço de controlo que possui meio de cultura. A CMI corresponde à concentração mais baixa de agente antimicrobiano na qual há inibição do crescimento. [26]

As cartas TSA são selecionadas consoante a identificação definitiva do microrganismo: AST-P648 – *Staphylococcus* spp.; AST-P586 – *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus* spp.; AST-ST 03 – *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus viridans*; AST-N 355 – Bactérias de Gram negativo fermentadoras (por exemplo, *Enterobacteriaceae* spp.); AST-N 373 – Bactérias de Gram negativo não fermentadoras (por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*) e antibióticos de segunda linha; AST-YS08 – leveduras.

Tabela 13. Densidade do inóculo, em McFarland (McF), adequada a cada microrganismo.

Microrganismos	Densidade do inóculo
Bactérias aeróbias (exceto <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.)	0,5-0,63 McF
Leveduras	1,80-2,20 McF
Bactérias anaeróbias, <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp,	2,70-3,30 McF

Em seguida, retira-se uma colónia isolada com uma ansa esterilizada e prepara-se uma suspensão numa solução salina. A densidade da suspensão é verificada através do VITEK-2DensiCHEK e depende do microrganismo isolado (Tabela 13). A carta de TSA e a suspensão diluída são colocadas numa cassete e introduzidas no equipamento. No interior do VITEK-2 a suspensão é inoculada nos poços. Durante o período de incubação, o aparelho monitoriza o crescimento de microrganismos em cada poço de teste, em relação ao poço de controlo, através da medição da turbidimetria. A ausência de turvação no poço equivale à inibição de crescimento, ou seja, sensibilidade face à concentração de antimicrobiano existente nesse poço teste. Depois da análise de todos os poços, os valores de CMI são determinados e os resultados são classificados pelo equipamento como “sensível”, “intermédio” ou “resistente” perante o painel de antimicrobianos da respetiva carta. [26]

Adicionalmente, o SPC realiza o TSA das micobactérias pertencentes ao CMT (com o teste rápido imunocromatográfico *SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid* positivo e crescimento nos meios Löwenstein–Jensen e MGIT). Porém o número de colónias no meio líquido MGIT indicado pelo aparelho BACTEC MGIT 960 BD tem que ser superior a 400, caso contrário o meio é reincubado até atingir as 400 colónias (soma dos dois resultados de incubação). O TSA é necessário para a escolha do tratamento adequado de doentes com tuberculose. O tratamento é frequentemente realizado através de um conjunto de agentes antimicrobianos estreptomicina, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e/ou etambutol. É importante que os agentes antimicrobianos utilizados demonstram eficácia contra a micobactéria CMT isolada.

Em termos práticos, dilui-se o meio líquido positivo num fator de 1:5 com solução salina estéril. Depois coloca-se 0,8 mL de suplemento nutricional e 0,1 mL de inóculo diluído

em cinco meios líquidos MGIT (utiliza-se um meio como controlo). Posteriormente, pipeta-se 0,1 mL de um agente antimicrobiano (estreptomicina, isoniazida, rifampicina ou etambutol) nos restantes quatro meios líquidos. Repete-se o procedimento para outro *kit* que contém apenas o controlo e pirazinamida. Procede-se à incubação dos sete meios líquidos no BACTEC MGIT 960 BD no prazo de 14 dias. A ausência de crescimento microbiano num determinado meio líquido com agente antimicrobiano, em relação ao meio de controlo positivo, é indicativa da sensibilidade da micobactéria a esse fármaco, sendo útil no tratamento da doença.

5.7. Subsecção Parasitologia

5.7.1. Fezes

As fezes constituem o produto biológico mais comum em exames parasitológicos, pois a maioria das estruturas parasíticas são eliminadas pela via gastrointestinal. As principais estruturas são o parasita em si ou parte dele, ovos e larvas de parasitas metazoários, bem como quistos e ooquistos (forma de resistência) e trofozoítos (forma de vida ativa) de parasitas protozoários. Porém estas estruturas são eliminadas nas fezes de forma intermitente e, portanto, realiza-se a colheita em três dias alternados, não ultrapassando os 10 dias. [27]

O exame parasitológico compreende duas etapas essenciais: o exame macroscópico e o exame microscópico. No exame macroscópico observa-se a consistência (trofozoítos são mais comuns em fezes líquidas, enquanto os quistos são geralmente encontrados em fezes formadas), cor, muco, sangue, presença de larvas e parasitas metazoários. Antes de proceder ao exame microscópico das fezes é utilizado um *kit REAL Mini-System* que combina o método de sedimentação com o método de concentração de Richie, de modo a concentrar as estruturas parasíticas num pequeno volume.

O *kit REAL Mini-System* é composto por um tubo de amostra que contém uma solução fixadora e filtros, bem como um tubo de sedimentação. Numa fase posterior, o sedimento é ressuspenso em Lugol (corante para destacar as estruturas dos parasitas). Inicialmente pesquisa-se presença de ovos e larvas ao microscópio na objetiva de 10x e quistos, ooquistos e trofozoítos na objetiva de 40x.



Figura 9. Observação ao microscópio, na objetiva de 40x, de um ovo de *Taenia* spp. Preparação corada com Lugol. (Fotografia tirada no SPC do HNM).

Adicionalmente, a subsecção dispõe de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral, CerTest *Giardia*, para a pesquisa de antígenos de *Giardia lamblia*. Porém os resultados positivos só podem ser validados com um exame microscópico positivo para o mesmo parasita. A giardíase é uma doença diarreica provocada pelo parasita intestinal *Giardia lamblia*. Pode

apresentar dois estados no seu ciclo de vida: o trofozoítio que produz os antigénios α -I giardin e o quisto que produz os antigénios CWPI. Após o hospedeiro ingerir os quistos por via fecal-oral ou por água e alimentos contaminados, estes convertem-se em trofozoítios no intestino e sofrem divisão. Porém alguns trofozoítios enquistam e são eliminados nas fezes do hospedeiro [28]. A presença de antigénios α -I giardin e/ou CWPI resulta numa banda corada no zona de teste, juntamente com uma banda na zona controlo que verifica o volume de amostra e reagentes.

6. Secção Endocrinologia

O sistema endócrino consiste num conjunto de glândulas, tais como o hipotálamo, glândula pineal, hipófise (ou glândula pituitária), tiróide, paratiróide, timo, glândulas suprarrenais (ou adrenais), pâncreas e gónadas (ovários ou testículos), tal como se pode observar na Figura 10. Estas glândulas são responsáveis pela secreção de diversas hormonas que realizam a comunicação entre células e tecidos, regulando o desenvolvimento embrionário, cognição, metabolismo celular, homeostase do organismo, cognição e mudanças reprodutivas. [30]

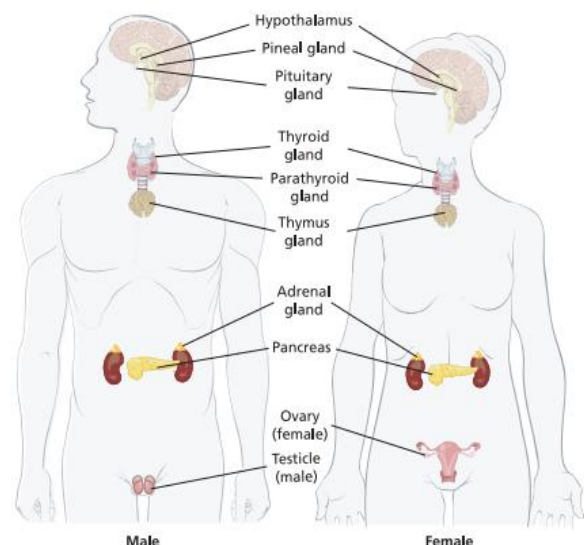


Figura 10. Glândulas do sistema endócrino. [29]

Adicionalmente, a produção e secreção de hormonas pelo sistema endócrino é estreitamente regulada pelo SNC através do hipotálamo, bem como por mecanismos de retrocontrolo negativo. Neste sentido, estímulos percebidos pelo SNC regulam a secreção de hormonas libertadoras ou inibidoras por neurónios hipotalâmicos. Certas hormonas hipotalâmicas (ocitocina e vasopressina) são libertadas no lóbulo posterior da hipófise através do qual entram diretamente na corrente sanguínea. Por outro lado, as restantes hormonas hipotalâmicas são libertadas no lóbulo anterior da hipófise, onde atuam sobre células endócrinas, que por sua vez, secretam hormonas hipofisárias para a corrente sanguínea. [30]

As hormonas libertadas na corrente sanguínea são transportadas às respetivas células alvo que possuem recetores superficiais (no caso de hormonas hidrofílicas) ou no seu interior (no caso de hormonas hidrofóbicas). Em resultado desta interação hormona-recetor gera-se uma cascata de reação bioquímica que culmina nos efeitos das referidas hormonas. [30]

6.1. Amostras

Na secção de Endocrinologia a principal amostra analisada é o soro, porém diversos analitos são doseados no plasma ou urina de 24 horas (Anexo 7). Caso se pretenda dosear certos parâmetros e não for possível fazê-lo no próprio dia congela-se a amostra.

As amostras de plasma usadas para a determinação da paratormona (PTH) e da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) requerem colheita, centrifugação e conservação a frio. As amostras de plasma usadas para a determinação de renina são colhidas e centrifugadas à temperatura ambiente, sendo congeladas a -20°C após a receção para evitar degradação.

A colheita de urina de 24 horas é realizada pelo próprio utente, tendo o mesmo que rejeitar a primeira urina da manhã e recolher todas as micções seguintes ao longo das 24 horas. Atenta-se que, durante as colheitas o frasco de urina deve ser armazenado no frigorífico. A urina de 24 horas é utilizada para o doseamento de cortisol, peptídeo C, aldosterona, catecolaminas (norepinefrina, epinefrina e dopamina) e derivados de catecolaminas (metanefrinas, normetanefrina, 3-metoxitiramina, ácido vanilmandélico, ácido homovanílico e ácido 5-hidroxi-indolacético). Atenta-se que para o doseamento de catecolaminas e derivados, o utente tem que cumprir uma restrição alimentar, durante dois dias antes da colheita e no próprio dia da colheita, de modo a prevenir interferências analíticas alimentares. Estas restrições incluem a proibição de ingestão de refrigerantes, chocolate, cacau, café, chá, bebidas alcoólicas, efervescentes, vegetais, beterraba, beringela, tomate, kiwi, banana, ananás, citrinos, nozes, baunilha, gelados, caramelos e marmeladas. Adicionalmente, as alíquotas de 10ml urina de 24 horas utilizadas para o doseamento de catecolaminas e derivados são conservadas com duas gotas de ácido clorídrico no congelador até serem analisadas.

6.2. Metodologias

A secção da Endocrinologia possui diversos equipamentos que permitem o doseamento automático de parâmetros analíticos, porém a maioria dos equipamentos utiliza uma metodologia em comum, o imunoensaio. Esta técnica baseia-se no princípio de interação específica entre um anticorpo e um antigénio. Os métodos de deteção de imunocomplexos em amostras de soro, plasma e urina são a quimioluminescência e eletroquimioluminescência.

6.2.1. Imunoensaios

Os imunoensaios possuem como características marcantes a elevada especificidade, sensibilidade e flexibilidade analítica derivadas das propriedades dos anticorpos. A reação de imunoensaio pode ser classificada em dois tipos distintos conforme o analito em estudo,

nomeadamente imunoensaio não competitivo (*sandwich*) e imunoensaio competitivo. O imunoensaio *sandwich* é utilizado para a deteção de analitos de elevado peso molecular. Baseia-se na determinação qualitativa e quantitativa de analito numa amostra através da aplicação de dois anticorpos monoclonais específicos. Primeiramente, o anticorpo primário específico interage com o analito e posteriormente é adicionado um segundo anticorpo marcado com uma substância produtora de sinal. O segundo anticorpo liga-se a epítomos do antigénio que são distintos daqueles reconhecidos pelo anticorpo primário, formando-se assim um complexo imunitário em *sandwich*. Adicionalmente, a quantidade de analito na amostra é diretamente proporcional à intensidade do sinal detetado. [31]

Por outro lado, o imunoensaio competitivo é utilizado para a deteção de analitos de baixo peso molecular. Baseia-se no princípio de competição de ligação entre o analito da amostra e um analito análogo marcado (com uma substância produtora de sinal) a uma quantidade limitada de anticorpo específico. Assim, a quantidade de analito na amostra é inversamente proporcional à intensidade do sinal. [32]

6.2.2. ElectroChemiluminescence ImmunoAssay (ECLIA)

A técnica de imunoensaio associado à eletroquimioluminescência (ECLIA – *ElectroChemiluminescence ImmunoAssay*) determina a maioria dos parâmetros da secção de Endocrinologia e é empregue pela cadeia de equipamentos Cobas (ROCHE) que se encontra dividida em módulos. No princípio *sandwich*, o equipamento emprega, numa primeira etapa, a amostra com dois anticorpos monoclonais, um marcado com biotina e outro com um complexo de ruténio. Por outro lado, no imunoensaio competitivo é utilizado um analito marcado com biotina e um anticorpo marcado com um complexo de ruténio. Durante a segunda etapa, o complexo imunitário liga-se a micropartículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina, através da interação biotina-estreptavidina. A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, na qual os imunocomplexos são magneticamente capturados pelo eléctrodo de platina, sendo os restantes elementos eliminados pela solução *ProCell* que contém tripopilamina (TPA), essencial para a reação eletroquimioluminescente. Por fim, a aplicação de uma corrente elétrica no eléctrodo de platina catalisa uma reação oxidação-redução entre a TPA e o complexo de ruténio, e por consequência, emissão de sinal quimioluminescente que é detetado por um fotomultiplicador a 620nm, sendo convertido em unidades de concentração [33]. Existem testes com tempos de incubação de 9 minutos (parâmetros de urgência), 18 minutos (maioria dos parâmetros) ou 27 minutos (requerem pré-tratamento).

6.2.3. Chemiluminescence ImmunoAssay (CLIA)

A técnica de quimioluminescência (CLIA – *Chemiluminescence ImmunoAssay*) é utilizada pelos equipamentos UniCel DXI 800, Beckman Coulter e Maglumi 600, Snibe. O CLIA baseia-se na emissão de luz (luminescência) derivada de uma reação química que sinaliza a formação de um imunocomplexo. No imunoensaio *sandwich* do UniCel DXI 800, Beckman Coulter são utilizadas micropartículas paramagnéticas revestidas com anticorpos monoclonais, específicos para o analito a dosear na amostra, bem como anticorpos monoclonais marcados com fosfatase alcalina. Porém, no ensaio competitivo a fosfatase alcalina encontra-se ligada a um análogo do analito. Durante o período de incubação, forma-se um imunocomplexo e os componentes não ligados são eliminados por meio de lavagens sucessivas. A adição de dioxetano inicia a emissão de sinal quimioluminescente assim que reage com a fosfatase alcalina [34]. O sinal é detetado e convertido em unidades de concentração.

Em relação ao equipamento Maglumi 600, Snibe, no imunoensaio *sandwich* são utilizados anticorpos monoclonais marcados com FITC (*Fluorescein Isothiocyanate Isomer*), anticorpos monoclonais marcado com ABEI (*N-(4-Aminobutyl)-N-Ethylisoluminol*) e microesferas magnéticas revestidas com anticorpos monoclonais anti-FITC. Numa primeira fase, o analito presente na amostra forma um imunocomplexo em *sandwich* com os anticorpos marcados com ABEI e FITC. Por outro lado, no ensaio competitivo o ABEI encontra-se ligado a um análogo do analito a dosear. Posteriormente, são adicionadas as microesferas magnéticas que se ligam aos imunocomplexos e permitem a separação dos mesmos aquando do processo de lavagem, sob influência de num campo magnético. Depois são adicionadas soluções iniciadoras de reação por quimioluminescência, o sinal de luz é medido por um fotomultiplicador e convertido em unidades de concentração. [35]

6.2.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

O equipamento 1260 *Infinity*, *Agilent Technologies* utiliza a técnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) de fase reversa, que consiste na separação de analitos provenientes de uma amostra de urina de 24 horas através da sua distribuição entre duas fases imiscíveis (fase móvel e fase estacionária). Primeiramente, a fase móvel líquida de concentração constante é bombeada em elevada pressão, juntamente com os analitos da amostra, ao longo de uma coluna cromatográfica, que contém a fase estacionária. Os compostos que apresentam uma maior afinidade com a fase móvel em relação à fase estacionária são eluídos mais rapidamente. Em seguida, a passagem dos analitos no detetor eletroquímico gera uma diferença de potencial que é convertida num gráfico, o cromatograma, sob a forma de picos

em função do tempo de retenção (tempo necessário para percorrer a coluna). Ao interpretar um cromatograma, é possível identificar os compostos pelo seu tempo de retenção característico, bem como quantificá-los pela área do pico, que é proporcional à concentração de analito. Para tal, as amostras são previamente fortificadas com um controlo interno de concentração conhecida, cuja área do pico é comparada com a dos compostos. [36]

Neste sentido, o HPLC requer um tratamento prévio das amostras para remover interferências analíticas e evitar eventuais danos à coluna. Consoante o tipo de analito é utilizado um pré-tratamento específico, definido na bula do teste, em colunas de extração. Durante esta etapa de pré-tratamento, são preparados calibradores e controlos do mesmo modo que as amostras e adiciona-se a cada um destes e às amostras o controlo interno.

6.3. Determinações analíticas

A maioria dos parâmetros são doseados por equipamentos automáticos que utilizam métodos de imunoensaio associados à eletroquimioluminescência (Cobas, ROCHE) e quimioluminescência (Maglumi 600, Snibe e UniCel DXI 800, Beckman Coulter). Porém, outros parâmetros são analisados por HPLC (*1260 Infinity, Agilent Technologies*), ver Anexo 7.

6.3.1. Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas produzidas, metabolizadas ou secretadas por células neoplásicas ao longo do desenvolvimento tumoral ou pelo próprio hospedeiro em resposta a este processo, sendo libertados para os fluídos biológicos. Tais marcadores têm sido utilizados como ferramenta auxiliar no diagnóstico de processos tumorais, para diferenciar tecidos normais de neoplásicos e na monitorização do estado de doença durante a terapia anti-tumoral. Um marcador tumoral ideal deve ser altamente específico e sensível para um determinado tipo de tumor e os níveis do marcador devem se correlacionar com precisão com a carga tumoral de modo a refletir quaisquer progressões ou recidivas. [37]

Os marcadores tumorais englobam diversas moléculas, incluindo antigénios de superfície celular (por exemplo glicoproteínas), proteínas citoplasmáticas (por exemplo, citoqueratinas), enzimas, hormonas e antigénios oncofetais. [37]

6.3.1.1. Antígeno específico da próstata (PSA)

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína formada principalmente na glândula prostática e tem como função a liquefação do sémen e aumento da motilidade dos espermatozoides. Pode encontrar-se na forma complexada com inibidores enzimáticos ou na

forma inativa livre. As principais aplicações da determinação do PSA total (complexado e livre) são a monitorização da progressão do carcinoma da próstata e da eficiência da terapêutica. Apesar do PSA total ser um marcador com elevada sensibilidade para deteção do cancro da próstata possui uma baixa especificidade, ou seja, é relativamente específico de órgão, mas não é específico do tipo de alteração prostática, podendo estar aumentado devido a inflamação ou estimulação da próstata. [38, 39]

De modo a aumentar a especificidade deste parâmetro nos utentes em que o doseamento de PSA total esteja situado na zona de dúvida (4-10ng/mL) é determinada a razão entre as concentrações de PSA livre e PSA total no soro. O PSA livre é associado a doença benigna da próstata ou à ausência de doença, portanto, uma razão PSA livre/total baixa é indicativa de carcinoma da próstata. [38]

6.3.1.2. Antigénio carcino embrionário (CEA)

O antigénio carcino embrionário (CEA) é um antigénio oncofetal produzido durante o período embrionário e fetal, sendo a sua produção suprimida após o nascimento. Observam-se frequentemente concentrações elevadas de CEA nos casos de adenocarcinoma colorretal e aumentos ligeiros em doenças não malignas dos intestinos, pâncreas, ovários e pulmões. A principal indicação da determinação de CEA é a monitorização do tratamento do carcinoma colorretal e avaliação de recidivas e metástases. [40]

6.3.1.3. Alfa I-fetoproteína (AFP)

A alfa I-fetoproteína (AFP) é um antigénio oncofetal produzido durante o período embrionário e fetal pelas células hepáticas fetais. Nos adultos, níveis séricos elevados de AFP podem ser derivados de diversas situações clínicas como a gravidez, doenças tumorais (por exemplo, o carcinoma hepatocelular, carcinoma gástrico, cancro do pulmão, cancro do pâncreas e cancro do testículo), bem como em patologias não tumorais (por exemplo, hepatite crónica). No entanto, o seu doseamento é fundamental como auxiliar de rastreio, diagnóstico e monitorização de terapêutica do carcinoma hepatocelular e de tumores de células germinativas (por exemplo, cancro do testículo). [41]

6.3.1.4. Antigénio carboidrato 125 (CA 125)

O antigénio carboidrato 125 (CA 125) é um peptídeo da mucina 16 expresso maioritariamente no revestimento do epitélio de órgãos do trato reprodutor feminino. Na prática clínica tem sido utilizado como auxiliar de rastreio, diagnóstico e monitorização de

terapêutica de carcinoma epitelial do ovário e de massas pélvicas. Porém, os níveis séricos de CA 125 podem se encontrar aumentados devido à menstruação, gravidez ou a doenças benignas como quistos do ovário, endometriose, doença hepática, pancreática, inflamatória pélvica, pulmonar e pleural. [42]

6.3.1.5. Antigénio carboidrato 19-9 (CA 19-9)

O antigénio carboidrato 19-9 ou antigénio Lewis a sialilado (CA 19-9) é uma glicoproteína produzida pelo pâncreas, células do ducto biliar e pelos epitélios gástrico, cólon, endometrial e salivar. Adicionalmente, pode encontra-se em concentrações elevadas no soro devido ao cancro do pâncreas, hepatobiliar, hepatocelular, gástrico, colorretal e de mama. Atualmente, o CA 19-9 não está indicado para auxiliar o rastreio de tumores pois aproximadamente 6% da população com grupo sanguíneo de Lewis negativo não produzem CA 19-9, nem mesmo na presença de tumor. Contudo constitui um marcador de eleição na monitorização de terapêutica em utentes com adenocarcinoma do pâncreas. [43]

6.3.1.6. Antigénio carboidrato 15-3 (CA 15-3)

O antigénio carboidrato 15-3 (CA 15-3) deriva da glicoproteína Mucina-I e é expresso principalmente em células epiteliais glandulares, como por exemplo do tecido mamário. Durante o processo neoplásico, o tecido epitelial sofre modificação e disrupção gradual, libertando no soro elevadas quantidades de CA 15-3 aberrantemente glicado. O CA 15-3 aparenta desempenhar funções na adesão celular e estar envolvido no processo de metastização tumoral. Tendo isto em consideração, tem sido utilizado globalmente como um marcador do cancro da mama, nomeadamente como auxiliar de diagnóstico e rastreio, bem como na monitorização da terapêutica anti-tumoral e avaliação de recidivas e metástases. [44]

6.3.1.7. Antigénio carboidrato 72-4 (CA 72-4)

O antigénio carboidrato 72-4 (CA 72-4) é uma glicoproteína expressa na superfície de células tumorais do estômago, cólon, ovário, pâncreas, mama e pulmões. Enquanto o CEA, CA 125 e CA 19-9 são usados como marcadores tumorais para o cancro do gastrointestinal, ovário e pâncreas, respetivamente, o CA72-4 é apenas utilizado como marcador tumoral secundário para a monitorização da eficácia do tratamento contra estes tipos de cancro, sendo doseado em associação com os marcadores anteriormente referidos. [45]

6.3.1.8. Enolase neuro-específica (NSE)

A enolase neuro-específica (NSE) ou enolase γ é uma isoenzima neuro-específica da enzima enolase glicolítica, sendo produzida por neurónios e células neuroendócrinas periféricas. Na prática clínica, tem sido fundamental como ferramenta auxiliar no diagnóstico e rastreio de cancros neuroendócrinos, tais como o carcinoma pulmonar de pequenas células e neuroblastoma, bem como na monitorização da terapêutica e avaliação de formação de metástases. Porém, níveis elevados de NSE podem resultar de outros tumores e condições clínicas, tais como: o melanoma, carcinoma das células renais, hemorragia intracerebral, traumatismo craniano, acidente isquémico e doenças cerebrais inflamatórias. [46]

6.3.1.9. Citoqueratina fração 21-1 (Cyfra 21-1)

As citoqueratinas são proteínas estruturais que compõem os filamentos intermediários do citoesqueleto, tanto de células epiteliais normais como tumorais. A citoqueratina fração 21-1 (Cyfra 21-1) é um fragmento solúvel da citoqueratina fração 19 e tem sido utilizada como um marcador tumoral para o diagnóstico e prognóstico de carcinoma pulmonar de células não pequenas, bem como no carcinoma da cabeça e do pescoço. É também fundamental para a monitorização da eficácia da terapêutica e deteção de desenvolvimento de metástases. [47]

6.3.2. Função tiroidea

Durante o estágio tive a oportunidade de contactar com maior frequência com casos de hipotiroidismo primário autoimune (tiroidite de Hashimoto), hipertiroidismo primário autoimune (doença de Graves), disfunções subclínicas da tiróide, bem como casos de monitorização de terapêutica e avaliação pós-cirurgia de remoção da tiróide (tiroidectomia) total ou parcial.

A tiróide é uma glândula endócrina composta por dois lóbulos conectados por um istmo. É composta por dois tipos distintos de células: foliculares, que produzem e armazenam o colóide (material viscoso maioritariamente constituído por tiroglobulina – Tg), e as células parafoliculares ou C, que secretam calcitonina. [30, 48]

A função tiroidea é regulada por um mecanismo de retrocontrolo negativo a nível do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide (Figura 11), daí a importância da compreensão deste eixo para a correta interpretação dos parâmetros analíticos. Neste sentido, o hipotálamo produz a hormona libertadora de tirotropina (TRH) que estimula o lóbulo anterior da hipófise a secretar a tirotropina ou hormona estimulante da tiróide (TSH). A TSH, por sua vez, atua ao

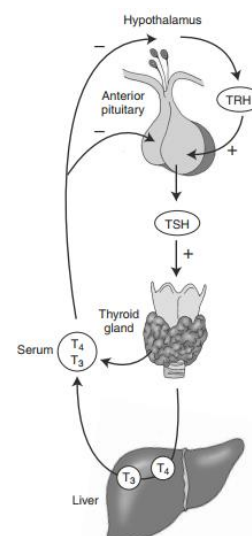


Figura 11. Mecanismo de retrocontrolo negativo do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide. [49]

nível do seu recetor na tiróide e induz a produção de hormonas tiroideas, nomeadamente a triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), processo dependente da ingestão de iodeto. Assim, quando os níveis séricos das hormonas tiroideas estão diminuídos, há um aumento na síntese e secreção de TRH e TSH, e vice versa no caso de estarem aumentados. [49]

6.3.2.1. Tirotropina (TSH), Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4)

Para avaliar a função tiroideia, é realizado o doseamento da TSH no soro, sendo o teste de primeira linha do SPC para este painel. A produção de TSH é influenciada pelo ritmo circadiano, porém a sua determinação constitui um parâmetro muito sensível e específico. Durante o estágio, o doseamento deste parâmetro permitiu auxiliar o diagnóstico de hipotiroidismo e hipertiroidismo, bem como monitorização de terapia de substituição em situações de hipotiroidismo, de terapia de supressão em situações de hipertiroidismo. [29,49]

Por um lado, a T4 constitui a principal hormona secretada pela tiróide, por outro, a T3 é essencialmente formada pelo processo de desiodinação da T4 nos tecidos periféricos, nomeadamente, no fígado (Figura 11). Adicionalmente, como estas hormonas são hidrofóbicas circulam na corrente sanguínea predominantemente na forma ligada a proteínas como a globulina de ligação à tiroxina (TBG), albumina e pré-albumina. [30, 48]

Tabela 14. Interpretação dos testes de primeira linha do SPC para a função tiroidea. [49]

	FT4 baixa (↓)	FT4 normal (↔)	FT4 elevada (↑)
TSH baixa (↓)	Hipotiroidismo secundário	Hipertiroidismo subclínico	Hipertiroidismo primário
TSH normal (↔)	Hipotiroidismo secundário	Eutiroidismo (fisiologia normal)	Hipertiroidismo secundário
TSH elevada (↑)	Hipotiroidismo primário	Hipotiroidismo subclínico	Hipertiroidismo secundário

A T4 livre (FT4) e a T3 livre (FT3) constituem as formas não ligadas a proteínas e biologicamente ativas, representando menos de 1% das formas totais. No SPC realiza-se preferencialmente a determinação de FT4 e FT3, pois tal permite excluir a influência de quaisquer alterações nas concentrações e propriedades das proteínas de ligação, como por exemplo, a gravidez, doenças agudas ou medicação por glucocorticoides e amiodarona [30, 48]. A FT4 é um parâmetro útil de primeira linha, juntamente com a TSH (Tabela 14).

Adicionalmente, a determinação da FT3 é utilizada em conjunto com a TSH e FT4 no diagnóstico do hipertiroidismo e de tirotoxicose factícia (ingestão excessiva de hormonas da tiróide) [30, 48]. Atenta-se, no entanto, que a determinação da FT3 não é utilizada pelo SPC

para o diagnóstico de hipotireoidismo, pois pode encontrar-se dentro dos valores de referência, visto que é formada essencialmente fora da tiróide. [51]

Em termos práticos, valores elevados de TSH com FT4 reduzida são indicativos de hipotireoidismo primário. A causa mais comum de hipotireoidismo primário é autoimune (tiroidite de Hashimoto), porém pode ser resultante do tratamento contra o hipertireoidismo (tratamento supressor da tiróide, iodo radioativo ou tireoidectomia), deficiência de iodo ou em casos mais raros, de etiologia congénita [51]. O hipotireoidismo secundário, sendo menos frequente que o primário, traduz-se na diminuição de ambas as TSH e FT4 e é resultante de distúrbios no eixo hipotálamo-hipófise ou do recetor de TSH. Em relação ao hipertireoidismo primário, as principais causas são a autoimune (doença de Graves) e tumoral (adenoma tóxico e bócio multinodular tóxico), sendo caracterizado pelo aumento de FT3 e FT4 com diminuição da TSH. No entanto, no hipertireoidismo secundário a TSH, FT4 e FT3 estão aumentadas. [48]

6.3.2.2. Anticorpos anti-tiroideos

Os autoanticorpos produzidos contra moléculas expressas na tiróide desenvolvem-se em resultado de uma resposta imunológica aberrante, levando à inflamação da tiróide (tiroidite) e dano tecidual. Estes anticorpos são doseados no SPC para investigar se a disfunção da tiróide, evidenciada pelas alterações da TSH, FT3 e FT4 tem uma causa autoimune. A peroxidase específica da tiróide (TPO) é uma enzima peroxidase presente na membrana das células foliculares, sendo responsável pela síntese de T3 e T4. Diversas formas de tiroidite de causa autoimune (tiroidite de Hashimoto e doença de Graves) apresentam títulos elevados de autoanticorpos anti-TPO (Tabela 15), sendo um parâmetro fundamental no diagnóstico e monitorização da terapêutica de tiroidite autoimune [30, 48]. Entretanto, se houver suspeita de tiroidite autoimune sem anticorpos anti-TPO detetados, são doseados os autoanticorpos anti-Tg, apesar de não ser um parâmetro tão sensível e específico. [53]

De igual modo, os autoanticorpos contra o recetor da TSH (TRAb) também são detetados em tiroidites autoimunes (Tabela 15). Podem ser classificados como estimuladores, bloqueadores ou neutros, dependendo do seu mecanismo de acção. Apesar de terem ações semelhantes à TSH, os anticorpos estimuladores não são regulados por mecanismos de retrocontrolo negativo, levando à ativação prolongada do recetor. Como resultado há hipertrofia da tiróide com conseqüente aumento da produção de hormonas T4 e T3. O TRAb é utilizado no diagnóstico e monitorização de terapêutica da doença de Graves. [54]

Tabela 15. Prevalência dos anticorpos anti-tiroideos. [49]

Anticorpos anti-tiroideos	População Geral	Doença de Graves	Tiroidite de Hashimoto
Anti-tiroglobulina (anti-Tg)	3%	12-30%	35-60%
Anti-peroxidase específica da tiróide (anti-TPO)	10-15%	45-80%	80-99%
Anti-recetor da TSH (TRAb)	1-2%	70-100%	6-60%

6.3.2.3. Tiroglobulina

A tiroglobulina é detetável no soro, sendo um marcador da presença de tecido tireoidiano ativo, uma vez que a tiróide é a sua única fonte. As concentrações de Tg podem aumentar pela estimulação da tiróide sob TSH, na sequência de qualquer disfunção tiroidea ou tumor no tecido da tiróide. Na prática clínica, a dosagem de Tg sérica é útil na monitorização pós-tiroidectomia em pacientes diagnosticados com carcinoma da tiróide de origem folicular. O seu nível sérico deverá, respetivamente, diminuir ou ser indetetável na sequência de tiroidectomia parcial ou total, caso contrário suspeita-se da presença de recidiva ou metástases. A determinação da Tg pode ser afetada pela presença de autoanticorpos anti-Tg, portanto, este parâmetro é invalidado no SPC quando se detetam anticorpos anti-Tg. [55]

6.3.2.4. Calcitonina

A calcitonina humana é uma hormona segregada principalmente pelas células parafoliculares da tiróide e é estimulada por níveis elevados de cálcio sérico. Atua como um inibidor da reabsorção osteoclástica óssea e estimula a excreção renal de cálcio de modo a garantir a homeostasia do metabolismo mineral. A situação clínica mais associada à hipersecreção da calcitonina é o carcinoma medular da tiróide, um tumor nas células parafoliculares. Sendo assim, a calcitonina constitui um parâmetro auxiliar para o diagnóstico e monitorização pós-terapêutica contra o carcinoma medular da tiróide. Porém, níveis de calcitonina moderadamente elevados podem ser derivados a outras patologias, tais como outros tumores neuroendócrinos e insuficiência renal. [56]

6.3.3. Marcadores cardíacos

Na secção de Endocrinologia do SPC são determinados marcadores bioquímicos indicativos de lesões no músculo cardíaco (miocárdio), tais como o enfarte agudo do miocárdio (EAM), sendo libertados na corrente sanguínea após o dano. Determinam-se também biomarcadores para avaliar o stress cardíaco e potenciais casos de insuficiência cardíaca.

6.3.3.1. Mioglobina

A mioglobina é uma proteína citoplasmática envolvida no transporte e armazenamento de oxigênio, no interior dos músculos cardíaco e esquelético. Devido ao facto de ser uma molécula relativamente pequena, é libertada na primeira hora após uma lesão do miocárdio, atingindo o pico de concentração 4-12 horas depois. Os valores basais são restabelecidos dentro de 24-36 horas. Como marcador cardíaco permite a deteção precoce de EAM, porém os níveis de mioglobina podem estar aumentados após lesões músculo-esqueléticas e devido a insuficiência renal, sendo um marcador pouco específico principalmente sem a análise conjunta com outros marcadores cardíacos. [57]

6.3.3.2. Troponina T de alta sensibilidade (cTnT-hs)

As troponinas são proteínas citoplasmáticas que compõem um complexo regulador da contração da musculatura estriada, incluindo o miocárdio. Este complexo é composto por três subunidades: a troponina C, troponina I, e troponina T. Quando ocorre a ligação do cálcio à troponina C há uma mudança conformacional do complexo, favorecendo a interação com a miosina e actina com conseqüente contração muscular. Adicionalmente, as troponinas possuem isoformas cardíacas que são libertadas durante os processos de lesão do miocárdio (por exemplo, EAM), ocorrendo um aumento nos níveis séricos ao fim de 2-3 horas, com um pico às 12-48 horas. Os níveis podem permanecer elevados por 4-10 dias. Quando há suspeita de EAM é necessário dosear as troponinas inicialmente e após três horas para perceber se efetivamente ocorreu lesão no miocárdio. No SPC é efetuada a determinação da isoforma cardíaca da troponina T de alta sensibilidade (cTnT-hs) que permite auxiliar o diagnóstico de EAM, com um valor preditivo negativo de 99%. [58]

6.3.3.3. N-terminal proBNP (NT-proBNP)

O peptídeo natriurético do tipo B (BNP) é uma hormona maioritariamente produzida pelos miócitos do ventrículo esquerdo, sob a forma de pró-peptídeo inativo (proBNP). O principal estímulo para a síntese e secreção de proBNP é o stress e estiramento do mesmo resultante do aumento da perfusão e pressão sanguínea no ventrículo esquerdo. Durante a sua secreção, o proBNP é clivado proteoliticamente em BNP e N-terminal proBNP (NT-proBNP), sendo que o BNP atua de modo a favorecer a diurese, vasodilatação e diminuição da perfusão cardíaca e da pressão sanguínea. O doseamento de NT-proBNP no SPC é realizado essencialmente para efetuar o diagnóstico inicial de insuficiência cardíaca. [59]

6.3.4. Função suprarrenal e Marcadores de hipertensão secundária

As glândulas adrenais ou suprarrenais são estruturas bilaterais situadas sobre os rins, sendo divididas em córtex e medula. O córtex adrenal é, por sua vez, subdividido em: a zona glomerulosa que secreta a aldosterona, a zona fasciculada que produz cortisol e a zona reticular, que produz androgénios. Adicionalmente, a medula adrenal corresponde à região central da glândula e é responsável pela secreção de catecolaminas. Além disso, a função suprarrenal e os marcadores de hipertensão secundária (renina, aldosterona e catecolaminas) são regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, que por sua vez, é regulado por estímulos externos (por exemplo, *stress*) e por mecanismos de retrocontrolo negativo. [60]

6.3.4.1. Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) e Cortisol

O hipotálamo secreta a hormona libertadora da corticotropina (CRH) que estimula a secreção da hormona adrenocorticotrópica (ACTH) pelo lóbulo anterior da hipófise. A ACTH, por sua vez, atua em diversas regiões do córtex suprarrenal, estimulando-as a produzirem aldosterona, cortisol e androgénios. As concentrações de ACTH apresentam uma variação diurna com níveis mais elevados de manhã e baixos à noite. [30]

O cortisol é um glucocorticosteróide regulado pelo ritmo circadiano, tendo concentrações séricas máximas pela madrugada (7-25 µg/dL), que diminuem até atingirem um nível noturno de 2-14 µg/dL. O cortisol estimula a gluconeogénese, proteólise e lipólise, além de possuir uma ação anti-inflamatória e imunossupressora. No SPC a determinação de cortisol sérico às 9, 16 e 21 horas, juntamente com o doseamento da ACTH, permite realizar o diagnóstico da síndrome de Cushing (hipersecreção de cortisol, dependente ou independente de ACTH) e da síndrome de Addison (hipossecreção de cortisol com níveis elevados de ACTH) [59]. Porém, o doseamento do cortisol na urina de 24 horas é o método de eleição no SPC para o diagnóstico da síndrome de Cushing, uma vez que este não é influenciado pelo ritmo circadiano. [62]

6.3.4.2. Renina e Aldosterona

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) constitui uma cascata hormonal responsável pelo controlo homeostático da pressão arterial e volume extracelular. Assim a desregulação do SRAA conduz à hipertensão e desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais. A renina é uma enzima secretada pelas células justaglomerulares dos rins em resposta a estímulos do sistema nervoso simpático, à diminuição da perfusão renal e à diminuição da concentração de sódio sérico. Inicialmente, a renina realiza a conversão do angiotensinogénio

produzido no fígado em angiotensina I, que é posteriormente convertida no epitélio pulmonar em angiotensina II. Por fim, a angiotensina II, dentre outras funções, estimula a secreção de aldosterona na glândula suprarrenal, hormona mineralocorticóide responsável pela reabsorção de sódio e excreção de potássio a nível renal. [63]

No SPC o doseamento da aldosterona, juntamente com a renina, permite essencialmente diagnosticar e monitorizar situações de hipertensão secundária a um hiperaldosteronismo. O hiperaldosteronismo primário é caracterizado pela sobreprodução de aldosterona pelas glândulas suprarrenais, com uma baixa concentração de renina plasmática. Por outro lado, o hiperaldosteronismo secundário é caracterizado pela sobreprodução de aldosterona resultante de níveis elevados de renina plasmática, após hiperestimulação do SRAA. A aldosterona pode ser medida no soro ou na urina de 24 horas, sendo que a última não é influenciada pelo ritmo circadiano. [30]

6.3.4.3. Catecolaminas e seus derivados

As catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina) são moléculas que agem como neurotransmissores e hormonas, sendo produzidas principalmente nas células cromafins da medula suprarrenal e no cérebro. O excesso de catecolaminas e seus derivados (metanefrinas, normetanefrina, 3-metoxitiramina, ácido vanilmandélico, ácido homovanílico e ácido 5-hidroxi-indolacético) tem como principais consequências: hipertensão secundária, taquicardia, cefaleia, sudorese excessiva, ansiedade, tremores, perda de peso, palidez, náusea e vômitos.

No SPC, o doseamento de catecolaminas e seus derivados em amostras de urina de 24 horas tem como principal objetivo o diagnóstico de tumores produtores de catecolaminas em utentes com sinais e sintomas sugestivos. Os tumores produtores de catecolaminas podem ter origem na medula suprarrenal (feocromocitoma e neuroblastoma) ou ter origem neuroendócrina extra-suprarrenal (paraganglioma). [64]

6.3.5. Estudo de diabetes mellitus

A diabetes *mellitus* é um termo geral utilizado para designar um conjunto de distúrbios heterogêneos metabólicos, sendo o principal a hiperglicémia crónica resultante de alterações na secreção e/ou ação da insulina. [48]

6.3.5.1. Insulina e Peptídeo C

A pré-proinsulina é secretada nas células β dos ilhéus de Langerhans no pâncreas e é clivada em pró-insulina. Posteriormente, proteases degradam a pró-insulina em insulina e

peptídeo C. A ação da insulina é mediada por recetores específicos extracelulares e consiste principalmente na facilitação da captação de glicose pelas células do fígado, tecidos gordos e músculos, tendo assim uma função hipoglicemiante. [65]

No SPC, a determinação da insulina e do peptídeo C permite auxiliar o diagnóstico diferencial do tipo de diabetes *mellitus* (hiperglicémia). Na diabetes tipo I, devido ao processo autoimune, a produção de insulina e peptídeo C não ocorre ou é mínima. Por outro lado, na diabetes tipo 2, há produção de insulina (e conseqüentemente de peptídeo C), contudo não é capaz de atuar nos órgãos alvo devido à resistência dos recetores à sua ação. Adicionalmente, a determinação do peptídeo C também é utilizada como auxiliar no diagnóstico diferencial de hipoglicémia (distinguir hipoglicémia causada por administração de insulina exógena de hipoglicémia causada por insulinoma, um tumor produtor de insulina endógena). No caso de se tratar de um insulinoma há aumento na síntese de peptídeo C em paralelo com a insulina, ao contrário do que se observa na hipoglicémia por administração de insulina exógena. [66]

6.3.6. Estudo de anemias

A anemia é definida como uma condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue ou quantidade de eritrócitos está abaixo dos valores de referência estabelecidos. [67]

6.3.6.1. Folato, Vitamina B12 e Anticorpo anti-Fator Intrínseco

O folato e a vitamina B12 não são sintetizados pelo organismo humano, sendo obtidos por alimentação. As principais fontes de folato são os vegetais e fruta [66], enquanto a vitamina B12 é obtida essencialmente pela ingestão de carne, peixe, ovos e produtos lácteos. [69]

O folato pertence à família das vitaminas do grupo B e é vital para a manutenção de funções celulares normais, tais como a síntese dos precursores de purina e pirimidina dos ácidos nucleicos que compõem o DNA. Já a vitamina B12 é um cofator enzimático que, juntamente com o folato, está envolvido na síntese dos referidos precursores de DNA. A deficiência de folato pode dever-se a ingestão nutricional reduzida, má absorção intestinal ou por um aumento de necessidade (por exemplo, durante o esforço físico ou gravidez). Por outro lado, a deficiência de vitamina B12 pode ser devida a uma ingestão insuficiente e má absorção intestinal (por exemplo, por deficiência de fator intrínseco). [68, 70, 71]

No SPC a determinação de folato e vitamina B12 permite realizar o diagnóstico de anemias megaloblásticas (macroscíticas). Em situações de deficiência destes parâmetros há um comprometimento na síntese de DNA e da maturação celular, sendo observados eritrócitos macroscíticos e neutrófilos com núcleo hipersegmentado. Num caso particular, a anemia

perniciosa é um tipo de anemia megaloblástica que se deve à má absorção intestinal de vitamina B12, em consequência da deficiência de fator intrínseco, proteína sintetizada nas células parietais do estômago que favorece a absorção intestinal de vitamina B12. No seguimento de deficiência de vitamina B12, o SPC realiza o doseamento de anticorpos anti-fator intrínseco para o diagnóstico de anemia perniciosa autoimune. [71]

6.3.6.2. Ferritina

A ferritina é uma proteína sintetizada no fígado, sendo responsável pelo armazenamento de ferro intracelular. Deste modo o doseamento de ferritina permite avaliar as reservas de ferro do organismo, bem como detetar perturbações na homeostase e metabolismo do ferro. No SPC, realiza-se o doseamento deste parâmetro para distinguir situações de deficiência de ferro (por exemplo, anemia ferropriva) de situações de excesso de ferro (por exemplo, hemocromatose e anemia sideroblástica). Além disso, é uma proteína de fase aguda que se encontra aumentada em utentes com anemia inflamatória crónica. [72]

6.3.6.3. Eritropoietina

A eritropoietina é uma glicoproteína sintetizada no rim, sendo a sua produção estimulada em situações de deficiência de oxigénio sanguíneo (hipóxia). A eritropoietina tem como principal função a estimulação da eritropoiese, ou seja, produção de eritrócitos na medula óssea. A situação mais frequente em que se determina a eritropoietina no SPC é o diagnóstico de insuficiência renal crónica e ocasionalmente de poliglobulia (doença caracterizada por um aumento de eritrócitos acima dos valores de referência). Nas situações de insuficiência renal crónica a produção de eritropoietina é reduzida, enquanto na policitemia vera encontra-se em concentrações elevadas no soro. [67]

6.3.7. Metabolismo ósseo

6.3.7.1. Paratormona (PTH)

A PTH é produzida pelas glândulas paratiróides face à diminuição da concentração sérica de cálcio livre, sendo regulada por um mecanismo de retrocontrolo negativo quando a concentração de cálcio livre se encontra elevada. A sua síntese também é regulada, de forma semelhante, porém menos significativamente, pela concentração sérica elevada de magnésio, fosfato e vitamina D. A PTH induz o aumento dos níveis séricos de cálcio livre através de dois mecanismos: estimulação da reabsorção/desmineralização óssea pelos osteoclastos (libertação

de cálcio e fósforo do osso para a corrente sanguínea) e atuação no rim para aumentar a reabsorção de cálcio, excreção de fosfato e síntese de 1,25-dihidroxitamina D. [73]

No SPC a determinação da PTH, juntamente com a determinação de cálcio livre, permite essencialmente diagnosticar casos de hiperparatiroidismo primário (PTH e cálcio livre elevados) causado geralmente por adenomas da paratiróide, hiperparatiroidismo secundário (PTH elevada e cálcio livre reduzido) causado frequentemente por insuficiência renal crónica, bem como hipoparatiroidismo primário (PTH e cálcio livre reduzidos) em consequência da remoção cirúrgica das glândulas da paratiróide. [73]

6.3.7.2. Vitamina D total

A vitamina D é uma hormona esteróide sintetizada endogenamente pelas células da pele, após exposição solar, ou adquirida exogenamente através da alimentação. A vitamina D é convertida em 25-hidroxitamina D no fígado (principal forma circulante) e posteriormente em 1,25-dihidroxitamina D no rim (forma biologicamente ativa), esta última etapa é estimulada pela PTH quando os níveis de cálcio sérico livre se encontram reduzidos. Concretamente, a 1,25-dihidroxitamina D induz o aumento da absorção intestinal de cálcio e fosfato, minimizando os efeitos de reabsorção/desmineralização óssea pela PTH. [73]

No SPC, realiza-se o doseamento da vitamina D total para avaliar o metabolismo ósseo, principalmente no que diz respeito ao diagnóstico de raquitismo em crianças e osteomalacia em adultos, situações resultantes de deficiência de vitamina D e consequente desmineralização óssea. A deficiência de vitamina D é geralmente causada por: fraca exposição solar, dieta pobre em vitamina D e em insuficiência renal crónica. [73]

6.3.8. Hormonas da fertilidade

6.3.8.1. Hormona Folículo-Estimulante (FSH) e Hormona Luteinizante (LH)

A FSH e LH pertencem à família das gonadotropinas, sendo sintetizadas no lóbulo anterior da hipófise, sob estímulo da hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH) produzida no hipotálamo. Assim, a síntese destas hormonas é regulada por um mecanismo de retrocontrolo negativo no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas. A FSH e a LH sinergicamente estimulam o crescimento e o funcionamento das gónadas (ovários e testículos). [74]

Nas mulheres, a FSH promove o crescimento e maturação dos folículos ováricos durante a fase folicular do ciclo ovárico, bem como a secreção de estrogénio pelos folículos. Nos homens, a FSH estimula a espermatogénese testicular. Por outro lado, a LH induz a

ovulação e formação do corpo lúteo, que por sua vez, sintetiza a progesterona. Nas células de Leydig dos testículos, a LH estimula a produção de testosterona. [75]

No SPC, o doseamento de FSH e LH serve para reconhecer perturbações no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas. Estes parâmetros são requisitados com maior frequência para diagnosticar e avaliar situações de menopausa, infertilidade, irregularidades menstruais e amenorreia. Contudo, possibilita também o estudo de puberdade precoce ou tardia.

6.3.8.2. 17β-estradiol e Progesterona

Os estrogénios são responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias e do sistema reprodutor feminino, bem como o ciclo menstrual e manutenção da gravidez. Já a progesterona desempenha um papel fundamental na libertação de oócitos, facilitação de implantação intrauterina do zigoto, manutenção da gravidez e promoção da capacidade proliferativa e secretora das glândulas mamárias. [74, 76]

Os estrogénios e progesterona são produzidos, sob influência da FSH e LH, principalmente nos ovários, a nível das células do folículo (e corpo lúteo no caso da progesterona), bem como em pequenas quantidades nos testículos e córtex suprarrenal. Durante a gravidez, estas hormonas formam-se principalmente na placenta. O estrogénio biologicamente mais ativo é o 17β-estradiol, estando maioritariamente ligado à proteína *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG) e à albumina. [74]

No SPC, o doseamento de 17β-estradiol e progesterona é utilizado, em conjunto com a FSH e LH, para reconhecer perturbações no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas. Mais concretamente, permite distinguir situações de hipogonadismo primário causado pela disfunção das gónadas (FSH e LH elevadas com 17β-estradiol e progesterona reduzidos) de situações de hipogonadismo secundário (FSH e LH reduzidos com 17β-estradiol e progesterona elevados) causado por disfunção hipotálamo-hipófise. Tais disfunções de hipogonadismo são observadas em casos de infertilidade, irregularidades menstruais, amenorreia e puberdade precoce ou tardia. [75]

6.3.8.3. Testosterona total e livre

A testosterona é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias e espermatogénese. É sintetizada quase exclusivamente pelas células de Leydig nos testículos, sob estímulo da LH, sendo produzida em menor quantidade no córtex suprarrenal e ovários. A maior parte da testosterona circulante está ligada à SHBG e albumina, estando uma minoria sob a forma livre (biologicamente ativa). [75, 77]

No SPC, realiza-se o doseamento da testosterona total e livre, juntamente com a LH, para avaliar perturbações no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, bem como puberdade precoce ou tardia. As situações clínicas mais frequentes no laboratório para testosterona baixa incluem o diagnóstico de infertilidade masculina, enquanto situações de testosterona elevada em mulheres permitem diagnosticar o síndrome do ovário poliquístico e hirsutismo. [77]

6.3.8.4. Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)

A SHBG é uma proteína de transporte de androgénios (dihidrotestosterona e testosterona) e 17β -estradiol na corrente sanguínea, tendo uma maior afinidade para os androgénios. Deste modo, concentrações reduzidas de SHBG estão associadas a níveis elevados de testosterona livre, bem como aos sinais e sintomas característicos do excesso desta hormona. É doseada no SPC sobretudo para avaliar níveis elevados de testosterona livre em mulheres com irregularidades menstruais, diagnosticadas com síndrome do ovário poliquístico ou, menos frequentemente, com hirsutismo. [78]

6.3.8.5. Sulfato de Dehidroepiandrosterona (DHEA-S)

O DHEA-S constitui a principal forma de dehidroepiandrosterona em circulação. É um androgénio fraco sintetizado maioritariamente no córtex das glândulas suprarrenais, sob estimulação da ACTH, tal como foi referido anteriormente. Adicionalmente, o DHEA-S é um precursor esteróide na síntese de androgénios mais potentes (testosterona) e estrogénio. Assim, a determinação de DHEA-S no SPC é importante na avaliação da função suprarrenal como causa de hiperandrogenismo em mulheres (por exemplo, em casos de infertilidade, irregularidades menstruais, síndrome do ovário poliquístico ou até mesmo hirsutismo). [79]

6.3.8.6. Hormona Gonadotrófica Coriónica Humana (HCG)

A HCG pertence à família das gonadotropinas, juntamente com a FSH e LH, sendo produzida pelas células do trofoblasto (células que envolvem o embrião e dão origem à placenta) no contexto de gravidez. Possui duas subunidades (α e β), sendo que a subunidade β é responsável pelas suas funções como hormona análoga à LH, nomeadamente, a HCG induz a produção de progesterona pelo corpo lúteo durante as primeiras semanas da gravidez. [80]

A determinação quantitativa da HCG no soro pelo SPC permite essencialmente realizar a deteção precoce e monitorização da gravidez (níveis baixos são indicativos de aborto espontâneo). Adicionalmente, é de notar que a HCG elevada pode ser usada como marcador de tumores trofoblásticos, ováricos ou testiculares. [80, 81]

6.3.8.7. Prolactina

A prolactina é produzida pelo lóbulo anterior da hipófise predominantemente na forma monomérica (biologicamente ativa), dimérica (biologicamente inativa) e macroprolactina (baixa atividade biológica). Tem como principal função o desenvolvimento da glândula mamária durante a gravidez e a estimulação e sustentação da lactação no pós-parto. [82]

Quando os níveis de prolactina no soro se encontram acima dos valores de referência (hiperprolactinemia) e há manifestação clínica, fora do contexto de gravidez e lactação, as causas mais frequentes estão associadas a disfunções a nível hipotálamo-hipófise, como por exemplo o prolactinoma (tumor no lóbulo anterior da hipófise). A hipersecreção da prolactina suprime a produção da FSH e LH, e conseqüentemente, a sua ação sobre as gónadas. [82]

No SPC, a determinação de prolactina pode ser requisitada para o diagnóstico de infertilidade feminina, irregularidades menstruais, impotência nos homens e galactorreia (produção de leite em homens ou mulheres não grávidas ou lactantes). Adicionalmente, quando se deteta hiperprolactinemia é determinada a prolactina no soro após precipitação de macroprolactina com polietilenoglicol a 25% (numa proporção 1:1). Depois da centrifugação, doseia-se a prolactina no sobrenadante e determina-se os resultados sob a forma percentual de quociente de prolactina após centrifugação/prolactina da amostra original. Se o resultado for acima de 60% trata-se de uma situação de hiperprolactinemia, se o for abaixo de 40% trata-se de uma falsa hiperprolactinemia devida à macroprolactina. Para valores entre 40 e 60% considera-se o resultado como indeterminado. [82]

7. Casos Clínicos

7.1. Caso 1 – Múltiplas Infecções do Trato Urinário (ITU)

O caso clínico que se descreve em seguida foi selecionado visto que, para além de exemplificar a análise microbiológica da urina, uma das amostras com maior afluência no SPC, permite também elucidar a importância da realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) para garantir que o/a utente recupere da infeção e não desenvolva infeções secundárias oportunistas perante terapias antimicrobianas empíricas.

Uma utente de 87 anos, diabética, deu entrada no dia 20 de janeiro de 2022 no serviço de urgência do centro de saúde do Porto Santo, Dr. Francisco Rodrigues Jardim, com queixas de ardor ao urinar (disúria) e necessidade de urinar frequentemente (polaquiúria). Assim, foi colhida uma amostra de urina em monovette verde que foi posteriormente enviada ao SPC.

A urina apresentava-se turva e segundo o exame citológico continha algumas células epiteliais, raros eritrócitos e alguns leucócitos (ver Tabela 10), cuja presença é característica

de ITU. Os resultados foram confirmados pelo exame cultural em Uriselect4 que apresentava, após o período de incubação, crescimento de colónias azul-turquesa (ver Tabela I I) com uma densidade superior a 10^5 UFC/mL. Posteriormente, as colónias foram identificadas por MALDI-TOF-MS como sendo *Klebsiella pneumoniae* (bactéria de Gram negativo aeróbia às *Enterobacteriaceae* spp.), o que coincide com o aspecto das colónias no meio Uriselect4. Por fim, realizou-se o TSA por VITEK-2, aplicando a carta AST-N 355, apropriada para *Enterobacteriaceae* spp. Segundo os resultados do TSA (Tabela I 6), suspeita-se que se trata de uma *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL), visto que é resistente a todos os antibióticos da classe β -lactâmico, com exceção dos carbapenemos. As ESBL são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico de antibióticos da classe β -lactâmico, com exceção dos carbapenemos. Os carbapenemos são antibióticos utilizados como último recurso na terapêutica de infeções bacterianas, em especial para estirpes produtoras de ESBL [83], portanto a escolha de terapia foi o Meropenemo.

Tabela I 6. Resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), adaptados do boletim de análises do SPC do HNM.

Antibióticos da carta AST-N 355		Suscetibilidade da bactéria
β -lactâmico (penicilinas)	Ampicilina	Resistente
	Amoxicilina/Ácido clavulânico	Resistente
	Piperacilina/Tazobactam	Resistente
β -lactâmico (cefalosporinas)	Cerufoxima	Resistente
	Ceftazidima	Resistente
β -lactâmico (carbapenemos)	Ertapenemo	Suscetível
	Meropenemo	Suscetível
Aminoglicosídeos	Gentamicina	Resistente
	Amicacina	Suscetível
Ciprofloxacina		Resistente
Fosfomicina		Resistente
Colistina		Suscetível
Trimetoprim/Sulfametoxazol		Resistente

Entretanto, a utente deu novamente entrada no mesmo serviço de urgência no dia 6 de fevereiro de 2022 com sintomas de ITU (não especificados) e foi-lhe colhida uma nova amostra de urina em monovette verde. Ao exame citológico a urina continha raras células epiteliais, formas leveduriformes, pseudohifas e alguns leucócitos. Adicionalmente, o meio de cultura Uriselect4, após o período de incubação, apresentava colónias incolores com uma densidade de 10^3 UFC/MI, tendo sido valorizada devido à idade avançada da utente e pelo facto de ser diabética (fator de risco de ITU), ter história clínica de ITU recente e o exame

citológico ser indicativo de infeção fúngica. Como se observou formas leveduriformes, realizou-se uma subcultura em meio seletivo para fungos (CAN2), que após o período de incuba o, apresentou colónias azuis caraterísticas de *Candida albicans* (Figura 6), não tendo sido requisitado o TSA. A terapia instaurada foi uma combina o de um antifúngico (Fluconazol) com um antibiótico (Ciprofloxacina).

No dia 21 de março de 2022, a utente deu entrada no referido serviço de urgência com sintomas de ITU não especificados. A amostra de urina apresentava-se turva e com um exame citológico indicativo de uma segunda ITU fúngica, visto que a urina continha formas leveduriformes, muitos leucócitos, muitos eritrócitos e raras células epiteliais. Foi realizado um exame de Gram que demonstrou apenas formas leveduriformes e não pseudohifas caraterísticas de *Candida albicans* (Figura 7). Adicionalmente, o meio de cultura Uriselect4, apresentava crescimento de colónias incolores com uma densidade de 10^4 UFC/MI, tendo sido valorizado pelas mesmas razões referidas anteriormente. Confirmou-se que a levedura não era *Candida albicans* pela subcultura em meio CAN2, visto que o mesmo apresentou colónias incolores após o período de incuba o, ao invés de colónias azuis. Posteriormente, as colónias foram identificadas por MALDI-TOF-MS como sendo *Candida glabrata*. Não foi requisitado o TSA e a terapia empírica utilizada foi um antifúngico (Anidulafungina).

Esta utente, por ser mulher, ter idade avançada e diabetes já se encontrava sob risco elevado de desenvolver ITU, por exemplo por *Klebsiella pneumoniae*. Tendo isto em conta, e considerando que foi posteriormente submetida a uma terapia antimicrobiana (Meropenemo), ficou ainda mais exposta a uma ITU fúngica oportunista por *Candida albicans*, visto que a terapia possivelmente desregulou a microbiota comensal do trato urinário. Além do mais, não foi requisitado o TSA para a *Candida albicans* de modo a avaliar o perfil de suscetibilidade juntamente com a identifica o do microrganismo. O clínico/serviço requisitante preferiu instaurar uma terapia empírica com Fluconazol que de certo modo auxiliou o desenvolvimento da terceira ITU descrita, sendo provocada por *Candida glabrata*. Segundo a literatura, o aumento da utiliza o de Fluconazol contra infe es por *Candida* spp. tem dado origem ao desenvolvimento de estirpes fúngicas resistentes, principalmente de *Candida glabrata*. [84]

7.2. Caso 2 – Insuficiência Renal Cr nica (IRC) em Est dio V

O seguinte caso clínico foi selecionado devido ao facto de apresentar uma forte componente laboratorial para a sua análise, uma vez que durante o estágio não tive acesso ao processo e história clínica completa dos utentes. Para além disso, este caso permite demonstrar a rela o entre vários parâmetros medidos na sec o de Hematologia, Bioquímica

e Endocrinologia (Tabela 17), perante a respetiva situação clínica. Em concreto, trata-se de um homem de 31 anos sob tratamento de hemodiálise e que aguarda transplantação renal.

Tabela 17. Resultados obtidos pré-diálise, adaptados do boletim de análises do SPC do HNM.

Parâmetros	Resultado	Intervalo de Referência	Unidades
HEMATOLOGIA - Hemograma			
Leucócitos	4,3	4,2 – 10,8	10 ³ /μL
Eritrócitos	4,01	4,37 – 5,74	10 ⁶ /μL
Hemoglobina	12,4	13,7 – 17,3	g/dL
Hematócrito	37,5	40,0 – 51,0	%
VCM	93,5	80,0 – 99,0	fL
HCM	30,9	> 27,2	pg
CHCM	33,1	32,0 – 36,0	g/dL
RDW	15,3	11,5 – 15,0	%
Plaquetas	128,0	144,0 – 440,0	10 ³ /μL
BIOQUÍMICA			
Glicose	87,0	74,0 – 106,0	mg/dL
Ureia	166,0	16,6 – 48,5	mg/dL
Creatinina	12,28	0,70 – 1,20	mg/dL
Taxa de filtração glomerular estimada (Fórmula CKD-EPI)	5	> 60	ml/min/1,73m ²
Sódio	137,0	136,0 – 145,0	mEq/L
Potássio	5,90	3,50 – 5,10	mEq/L
Cloro	97,0	98,0 – 107,0	mEq/L
Magnésio	2,88	1,60 – 2,60	mg/dL
Cálcio	8,15	8,60 – 10,00	mg/dL
Fósforo inorgânico	7,60	2,50 – 4,50	mg/dL
Transferrina	175,4	200,0 – 360,0	mg/dL
Capacidade de Fixação do Ferro Total	219,2	250,0 – 450,0	mg/dL
Ferro sérico	31,1	33,0 – 193,0	μg/dL
Saturação de transferrina	14,2	20,0 – 50,0	%
Proteína C reativa	16,89	< 5,00	mg/L
ENDOCRINOLOGIA			
Ferritina	542,0	30,0 – 400,0	ng/mL
Paratormona (PTH)	973	15 – 65	pg/mL

A IRC em estágio V é definida pela Norma nº 017/2011 da Direção-Geral da Saúde por uma taxa de filtração glomerular inferior a 15 ml/min/1,73m², tendo este homem um valor de 5 ml/min/1,73m² (Tabela 17). O tratamento requer pelo menos uma técnica de terapêutica substitutiva da função renal: hemodiálise, diálise peritoneal e transplantação renal. [85]

A destruição progressiva e irreversível do tecido renal, com consequente perda de nefrónios funcionais, origina a IRC. Deste modo o rim perde a sua capacidade de filtração e excreção de produtos metabólicos, tais como a ureia e creatinina, bem como de potássio.

Assim, há retenção renal e aumento das concentrações séricas destes parâmetros (Tabela 17). Por outro lado, a IRC tende a diminuir sinergicamente as concentrações dos íons sódio e cloro, visto que há um comprometimento do mecanismo de reabsorção renal de sódio [86]. Porém os níveis deste íon encontram-se ligeiramente acima do limite inferior de referência.

Tal como foi referido nas páginas 48-49, o hiperparatiroidismo secundário constitui uma complicação clínica da IRC, porém tende a não se manifestar até a IRC atingir estádios avançados. Neste sentido, o rim perde a capacidade responder aos estímulos da PTH, e consequentemente, verifica-se uma diminuição da concentração sérica de cálcio (hipocalcémia) com um aumento das concentrações de fósforo inorgânico (hiperfosfatémia) e magnésio (Tabela 17). Em concreto, devido à falta de resposta renal à PTH, o rim não realiza de forma eficiente a reabsorção de cálcio, excreção de fósforo inorgânico e síntese de 1,25-dihidroxitamina D, resultando nas alterações de concentração anteriormente descritas. Adicionalmente, esta deficiência de 1,25-dihidroxitamina D potencia a hipocalcémia, visto que é responsável pela absorção intestinal de cálcio. Por fim, a hipocalcémia e hiperfosfatémia conduzem à sobreprodução de PTH (Tabela 17) numa tentativa de atenuar tais efeitos. [73]

Segundo o hemograma, verifica-se que o homem apresenta uma anemia, visto que os parâmetros de contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito estão abaixo dos intervalos de referência (Tabela 17). Adicionalmente, a anemia é normocrômica (VCM e CHCM dentro dos intervalos de referência) e normocítica (VCM dentro do intervalo de referência). A anemia geralmente se desenvolve durante o processo de perda progressiva da função renal, principalmente devido à deficiência de capacidade de produção renal de eritropoietina, hormona que estimula a eritropoiese (processo de produção e maturação de eritrócitos). Contudo, a IRC também constitui um processo inflamatório crónico (evidenciado pela proteína C reativa em concentração elevada) e como tal gera perturbações no metabolismo do ferro, que por sua vez potenciam a anemia. Concretamente, o processo inflamatório diminui os níveis de ferro sérico, transferrina, capacidade de fixação do ferro e saturação de transferrina. Por outro lado, induz um aumento nos níveis de ferritina, uma proteína de fase aguda inflamatória. A ferritina e a transferrina são, respetivamente, proteínas de armazenamento e transporte na corrente sanguínea do ferro. A capacidade de fixação do ferro total encontra-se reduzida devido à diminuição da transferrina, uma vez que reflete a capacidade total desta para se ligar ao ferro (Tabela 17). [87]

As alterações nos parâmetros de avaliação do metabolismo do ferro devem-se à produção de hepcidina no fígado durante o processo inflamatório. A hepcidina inibe a ação da proteína canal (ferroportina) que por sua vez, regula a absorção duodenal e mobilização do

ferro dos enterócitos intestinais, hepatócitos e macrófagos para a corrente sanguínea. Deste modo, o ferro fica retido com a ferritina no espaço intracelular, gera-se uma diminuição de ferro sérico circulante no sangue e conseqüente deficiência na síntese de hemoglobina. [87]

8. Fase pós-analítica

A fase pós-analítica compreende o conjunto de processos posteriores à análise da amostra, e inclui o armazenamento e eliminação de amostras, bem como a validação e envio dos resultados aos serviços requisitantes. A validação analítica consiste na verificação da conformidade dos resultados obtidos de acordo com as metodologias, condições de execução e controlo da qualidade interno, sendo da responsabilidade dos técnicos de secção. Por outro lado, a validação biopatológica consiste na correlação de todos os resultados obtidos nas diversas secções do laboratório, tendo em conta o seu estado clínico, boletins de resultados anteriores e os tratamentos a que está sujeito, sendo da responsabilidade de técnicos especialistas em Análises Clínicas ou de médicos especialistas em Patologia Clínica.

Informações com particular relevância clínica são comunicadas imediatamente ao clínico/serviço requisitante. O SPC possui uma comunicação telefónica com registo documentado de trocas de informação. Após a obtenção dos resultados, as amostras são arquivadas e armazenadas com recurso ao SIL por um período de tempo estipulado. Por fim, os resíduos e amostras são eliminados de acordo com o Despacho nº 242/96 do Ministério da Saúde, de modo a minimizar o impacto dos referidos no ambiente e na população.

9. Controlo de qualidade

O SPC do HNM é sujeito a um sistema de controlo de qualidade baseado na realização do Controlo de Qualidade Interno (CQI) e na Avaliação Externa de Qualidade (AEQ), a nível nacional e internacional, que têm como objetivo avaliar periodicamente o desempenho das secções do SPC e minimizar o erro laboratorial durante a fase analítica. Adicionalmente, existem indicadores de controlo de qualidade implementados para a monitorização das fases pré-analítica (nomeadamente, a atualização do manual de colheitas, transporte e critérios de rejeição de amostras no SPC, bem como o registo de erros de requisição, colheita, identificação, transporte, conservação e triagem) e pós-analítica (nomeadamente: o tempo de fornecimento de resultados e o registo dos erros de transcrição e validação). O SPC encontra-se acreditado pela Direção-Geral da Saúde, Departamento de Qualidade na Saúde, recorrendo ao modelo internacional de acreditação da ACSA (*Agencia de Calidad Sanitaria de Andalucía*).

9.1. Controlo de qualidade interno (CQI)

O CQI consiste na aplicação de um conjunto de procedimentos de monitorização e avaliação da qualidade de toda a fase analítica a nível intra-laboratorial. O objetivo do CQI é assegurar a precisão e reprodutibilidade dos resultados obtidos nas amostras dos utentes.

Para tal, cada secção do SPC desenvolve e implementa um sistema de CQI periódico antes do processamento das amostras dos utentes. Neste sistema são utilizadas amostras definidas como controlos internos, que para além de possuírem uma matriz biológica idêntica às amostras de utentes, contêm um ou mais analitos em concentrações conhecidas e próximas a pontos de decisão médica, ou seja, em concentrações estabelecidas como normais ou patológicas (nível alto ou baixo). Preferencialmente recorre-se a controlos internos independentes dos fornecidos pelos fabricantes dos reagentes e dos equipamentos.

Em termos práticos, são utilizados dois níveis de controlo interno (um normal e um patológico) ou três níveis de controlo interno (um normal e dois patológicos). Os controlos são processados exatamente do mesmo modo que as amostras de utentes seriam processadas e os resultados são representados em cartas de controlo gráficas de Levey-Jennings, visualizada no programa informático *Unity Real Time*, Biorad. Nestas cartas é possível analisar a dispersão dos resultados (desvio-padrão) em torno de um valor de média móvel, em função do tempo. As cartas de Levey-Jennings são inicialmente contruídas com os valores de média e desvio-padrão fornecidas pela bula dos controlos e, após cerca de 20 medições consecutivas para um determinado nível de controlo, obtêm-se os valores de média e desvio-padrão do laboratório.

A interpretação dos resultados das cartas de Levey-Jennings consiste na verificação da conformidade dos resultados com as regras de Westgard ativas no programa *Unity Real Time*, Biorad, para os limites aceitação (média \pm N desvio-padrão, em N é pode ser 1, 2 ou 3). Caso os resultados estejam em conformidade com as regras de Westgard e apresentem um comportamento estável ao longo do tempo e em torno dos limites de aceitação (ausência de erros aleatórios e sistemáticos detetáveis) é iniciado o processamento das amostras de utentes. Caso contrário, é necessário determinar a origem do erro pela verificação do estado do controlo interno, do estado do equipamento e do estado, validade e eventual mudança no lote dos reagentes. Após a deteção da origem do erro, este deve ser corrigido através da aplicação de medidas, tais como, a repetição da análise do controlo interno ou de uma nova alíquota do controlo, mudança de reagente, manutenção ou calibração do equipamento. Relativamente às últimas três ações corretivas referidas, é posteriormente analisado o controlo interno. Se após a implementação destas medidas corretivas o erro persistir o

técnico entra em contacto com o fornecedor do equipamento ou reagentes. Se o erro tiver sido corrigido, o laboratório está em condições de iniciar a análise das amostras dos utentes.

Adicionalmente, realiza-se a calibração do equipamento sempre que haja mudança no lote dos reagentes, no próprio equipamento ou no procedimento analítico. A calibração consiste na análise pelo equipamento, em duplicado, de dois níveis de calibradores diferentes.

Na secção de Microbiologia o controlo de qualidade interno é realizado, de 15 em 15 dias, através de estirpes conhecidas e provenientes da UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*). Estas estirpes destinam-se ao controlo da identificação microbiológica e do teste de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA). O SPC realiza também a monitorização diária da temperatura das estufas, mensalmente os registos de temperatura dos frigoríficos são verificados e de acordo com a frequência dos erros detetados é feita a gestão dos reagentes, meios de cultura, técnicas e equipamentos.

9.2. Avaliação externa de qualidade (AEQ)

A avaliação externa de qualidade é um programa de controlo inter-laboratorial, a nível nacional e internacional, definido por uma entidade de avaliação externa e possui uma programação prévia em termos de calendário de envio das amostras e do relatório de avaliação dos laboratórios participantes. O SPC participa em diversos programas de AEQ: Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade do Instituto Ricardo Jorge (INSA PNAEQ), *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)*, *The External Quality Assurance Services (EQAS)* e *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)*.

Perante a AEQ, o SPC recebe periodicamente amostras da entidade externa com uma breve descrição clínica, mas cujos resultados são desconhecidos ao SPC. As amostras são então processadas exatamente do mesmo modo que as amostras de rotina e os resultados são enviados à entidade externa. Tal entidade recolhe os resultados, avalia-os e envia um relatório estatístico que compara os resultados esperados com os obtidos por cada grupo de laboratórios participantes que utilizam o mesmo equipamento, metodologia e reagentes. Deste modo, a AEQ permite realizar uma avaliação retrospectiva do desempenho do SPC em relação ao grupo de laboratórios participantes, para além de aferir a exatidão dos resultados provenientes das diversas secções do SPC.

10. Conclusões

O Mestrado em Análises Clínicas e, em particular, o estágio curricular em que se encontra integrado constituíram uma das experiências mais desafiadoras com que me deparei, porém muito enriquecedoras, uma vez que revelaram ser uma mais-valia para o meu desenvolvimento, tanto a nível profissional como pessoal. Deste modo, o estágio permitiu a consolidação e aplicação em contexto prático dos conhecimentos adquiridos ao longo das diversas unidades curriculares do mestrado e aprofundamento de outros conceitos, para além de fornecer uma oportunidade para que eu pudesse desenvolver uma certa autonomia, responsabilidade e espírito crítico a nível da rotina de um laboratório clínico.

Em relação à Microbiologia, infelizmente não contactei com espécies de fungos para além da *Candida* spp., ou com espécies de parasitas para além de *Taenia* spp. e *Giardia lamblia*. Já na Endocrinologia, pude superar algumas dificuldades que tinha em relação às hormonas da fertilidade, uma vez que não tive uma formação académica sólida debruçada sobre as mesmas.

Não obstante à forte componente automatizada da fase analítica, fui capaz de compreender a base teórica das metodologias utilizadas, executar técnicas manuais e também tive a oportunidade de manipular, processar e analisar diversos produtos biológicos. Para além disso, adquiri diversas competências técnicas na fase pré-analítica e acompanhei a validação dos resultados na fase pós-analítica.

Adicionalmente, deparei-me com a importância e complexidade da implementação de um sistema de qualidade interno e da avaliação externa da qualidade laboratorial em todas as secções em que estagiei. Neste sentido, desenvolvi inúmeros conhecimentos para a avaliação do desempenho de qualidade dos testes laboratoriais executados na rotina.

Sendo Bioquímico, de formação base de Licenciatura, a área das Ciências da Saúde sempre me fascinou e despertou curiosidade. Assim, quando me candidatei ao Mestrado de Análises Clínicas já sabia que queria exercer a profissão de Técnico Superior de Saúde.

Em virtude dos factos mencionados, este relatório é o culminar de todo o esforço, dedicação e trabalho que tive ao longo destes últimos dois anos, e com a sua entrega e apresentação aproxima-se o fim de mais uma etapa na minha vida.

11. Referências Bibliográficas

- [1] TILLE, P. – **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 14ª Ed. Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-35482-0.
- [2] KRISTÓF, K.; PONGRÁCZ, J. – **Interpretation of Blood Microbiology Results: Function of the Clinical Microbiologist**. EJIACC. 27, 2 (2016), 147-155.
- [3] NOLTE, F. [et. al.] – **Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240)**. Journal of Clinical Microbiology. 31, 3 (1993), 552-557.
- [4] ZIMBRO, M.; Power, D. – **Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media**. 2ª Ed. Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN 0-9727207-1-5.
- [5] SHARMA, J. [et. al.] – **Blood Agar**. 1ª Ed. India: Orbit Biotech, 2018. [Acedido a 7 de março de 2022]. Disponível na Internet: <https://orbitbiotech.com/blood-agar-%CE%B1-hemolysis-%CE%B2-hemolysis-%CE%B3-hemolysis-alpha-prime-wide-zone-alpha-hemolysis-composition-procedure-usus/>
- [6] DANDO, S. [et. al.] – **Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion**. Clinical Microbiology Reviews. 27, 4 (2014), 691-726.
- [7] TUNKEL, A. [et. al.] – **Practice Guidelines for the Management of Bacterial Meningitis**. Clinical Infectious Diseases. 39, 9 (2004), 1267–1284.
- [8] SIRVEN, J.; MALAMUT, B. – **Clinical Neurology of the Older Adult**. 2ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. ISBN 978-0781769471.
- [9] BRIMS, F. [et. al.] – **Empyema thoracis: new insights into an old disease**. European Respiratory Review. 19, 117 (2010), 220-228.
- [10] FLORES, A.; CASERTA, M. – **Pharyngitis**. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. (2015), 753-759.
- [11] RELLO, J. – **Nosocomial Pneumonia: Strategies for Management**. 1ª Ed. Chichester: Wiley-Interscience, 2008. ISBN 9780470059555.
- [12] HAY, D. – **The Little Black Book of Gastroenterology**. 3ª Ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, Inc., 2010. ISBN 9780763777630.
- [13] HASSANAIN, W. [et. al.] – **Rapid ultra-sensitive diagnosis of *Clostridium difficile* infection using a SERS-based lateral flow assay**. Analyst. 146, 1 (2021), 4495-4505.
- [14] STORME, O. [et. al.] – **Risk factors and predisposing conditions for urinary tract infection**. Therapeutic Advances in Urology. 11, 1 (2019), 19-28.

- [15] UEMURA, E. [et. al.] – **URILAB CLED / MAC CONKEY**. 11ª Ed. Brazil: Laborclin, 2019. [Acedido a 15 de março de 2022]. Disponível na Internet: https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjAt7q628v3AhUT_BoKHcfeAewQFnoECA4QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.laborclin.com.br%2Fwp-content%2Fuploads%2F2019%2F05%2Furilab_cled_mac_conkey_bula_25012019.pdf&usq=AOvVawIq0lInfkzzvBoLpQ0Eywfn
- [16] Perry, J. – **A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics**. Clin Microbiol Rev. 30, 2 (2017), 449-479.
- [17] Guzel, A. [et. al.] – **Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species**. Medical Mycology. 49, 1 (2011), 16-25.
- [18] BARON, E. [et. al.] – **A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)**. Clin Infect Dis. 57, 4 (2013), 22-121.
- [19] MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. – **Medical Microbiology**. 9ª Ed. Digital: Elsevier, 2021. ISBN 978-0-323-67450-8.
- [20] GROSSET, J.; CHAISSON, R. – **Handbook of Tuberculosis**. 1ª Ed. Suíça: ADIS, 2017. ISBN 9783319262734.
- [21] BENTO, J. [et. al.] – **Métodos Diagnósticos em Tuberculose**. Acta Med Port. 24, 1 (2011), 145-154.
- [22] WILENIUS, K. – **Retrospective evaluation of the diagnostic accuracy of FluoroType® MTB assay used for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples in Greece**. Suécia: Universidade de Örebro, 2015. Tese de licenciatura.
- [23] MITRUKA, B. – **Methods of Detection and Identification of Bacteria**. 1ª Ed. Nova York: CRC Press, 1976. ISBN 978-0-203-71134-7.
- [24] COMPERNOLLE, V.; VERSCHRAEGEN, G.; CLAEYS, G. – **Combined Use of Pastorex Staph-Plus and Either of Two New Chromogenic Agars, MRSA ID and CHROMagar MRSA, for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus**. Journal of Clinical Microbiology. 45, 1 (2007), 154-158.

- [25] HOSSEINI, S.; MARTINEZ-CHAPA, S. – **Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis: Applications in Bio-diagnosis, Tissue Engineering and Drug Delivery**. 1^a Ed. Singapura: Springer, 2017. ISBN 978-981-10-2356-9.
- [26] GHERARDI, G. [et. al.] – **Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 72, 1 (2012), 20-31.
- [27] ZEIBIG, E. – **Clinical Parasitology: A Practical Approach**. 2^a Ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. ISBN 9780323292900.
- [28] ADAM, R. – ***Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis**. *Clinical Microbiology Reviews*. 34, 4 (2021), e00024-19.
- [29] LYNETTE, R. – **The Endocrine System: Human Body: How It Works**. 1^a Ed. New York: Chelsea House Publications, 2009. ISBN 978-1604133691.
- [30] RIFAI, N.; HORVATH, A.; WITTEWER, C. – **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 6^a Ed: Saint Louis: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-323-35921-4.
- [31] WILD, D. – **The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques**. 4^a Ed. Reino Unido: Elsevier, 2013. ISBN 9780080970370.
- [32] KANNAN, P. [et. al.] – **Faraday-Cage-Type Electrochemiluminescence Immunoassay: A Rise of Advanced Biosensing Strategy**. *Analytical Chemistry*. 91, 23 (2019), 14792-14802.
- [33] YU, H. – **Comparative studies of magnetic particle-based solid phase fluorogenic and electrochemiluminescent immunoassay**. *Journal of immunological methods*. 218, 1-2 (1998), 1-8.
- [34] IRANIFAM, M. – **Analytical applications of chemiluminescence systems assisted by carbon nanostructures**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 80, 1 (2016), 387-415.
- [35] YI, M. [et. al.] – **Determination of C-Reactive Protein Concentration in Serum Based on Chemiluminescence Analysis**. In: conferência, 8, Macau. International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation (ICMTMA). Macau: Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 2016.
- [36] AKASH, M. [et. al.] – **Essentials of Pharmaceutical Analysis**. 1^a Ed. Singapura: Springer, 2020. ISBN 978-9-81-151546-0.

- [37] SHARMA, S. – **Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines.** Indian J Med Paediatr Oncol. 30, 1 (2009), 1-8.
- [38] PEZARO, C.; WOO, H.; DAVIS, I. – **Prostate cancer: measuring PSA.** Internal Medicine Journal. 44, 5 (2014), 433-440.
- [39] LOURO, N. [et. al.] – **Avaliação comparativa dos valores de PSA total, PSA livre/PSA total e PSA complexado na detecção do cancro da próstata.** Acta Urológica. 24, 1 (2007), 39-44.
- [40] CHEVINSKY, A. – **CEA in tumors of other than colorectal origin.** Seminars in Surgical Oncology. 7, 1 (1991), 162-166.
- [41] DEBRUYNE, E.; DELANGHE, J. – **Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications.** Clin Chim Acta. 395, 1-2 (2008), 19-26.
- [42] DAOUD, E.; BODOR, G. – **CA-125 concentrations in malignant and nonmalignant disease.** Clinical Chemistry. 37, 11 (1991), 1968–1974.
- [43] SCARÀ, S.; BOTTONI, P.; SCATENA, R. – **CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects.** Adv Exp Med Biol. 867, 1 (2015), 247-60.
- [44] DUFFY, M. [et. al.] – **CA 15-3: A Prognostic Marker in Breast Cancer.** The International Journal of Biological Markers. 15, 4 (2000), 330-333.
- [45] MARIAMPILLAI, A. [et. al.] – **Cancer Antigen 72-4 for the Monitoring of Advanced Tumors of the Gastrointestinal Tract, Lung, Breast and Ovaries.** Anticancer Res. 37, 7 (2017), 3649-3656.
- [46] ISGRÒ, M.; BOTTONI, P.; SCATENA, R. – **Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects.** Adv Exp Med Biol. 867, 1 (2015), 125-143.
- [47] KUROPKAT, C.; LIPPERT, B.; WERNER, J. – **Follow-Up with Serum Cyfra 21-1 in Patients with Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck.** Oncology. 63, 3 (2002), 280-285.
- [48] REES, A.; LEVY, M.; LANSDOWN, A. – **Clinical Endocrinology and Diabetes at a Glance.** 1ª Ed. Reino Unido: John Wiley & Sons, 2017. ISBN 978-1119128717.
- [49] GROTZKE, M. – **The Thyroid Gland** In: BISHOP, M. [et. al.]. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations. 6ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1, 490-499.
- [50] SHLOMO, M. [et. al.] – **Williams Textbook of Endocrinology.** 12ª Ed. Philadelphia: Elsevier, 2011. ISBN 978-1-4377-0324-5.

- [51] PARRETTI, H.; OKOSIEME, O.; VANDERPUMP, M. – **Current recommendations in the management of hypothyroidism: developed from a statement by the British Thyroid Association Executive.** British Journal of General Practice. 66, 651 (2016), 538-540.
- [52] ALMANDOZ, J.; GHARIB, H. – **Hypothyroidism: Etiology, Diagnosis, and Management.** Medical Clinics of North America. 96, 2 (2012), 203-221.
- [53] SARAVANAN, P.; DAYAN, C. – **Thyroid autoantibodies.** Endocrinol Metab Clin North Am. 30, 2 (2001), 315-37.
- [54] BARBESINO, G.; TOMER, Y. – **Clinical Utility of TSH Receptor Antibodies.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 98, 6 (2013), 2247-2255.
- [55] SPENCE, C.; LOPRESTI, J. – **Technology Insight: measuring thyroglobulin and thyroglobulin autoantibody in patients with differentiated thyroid cancer.** Nature reviews endocrinology. 4, 1 (2008), 223-233.
- [56] ALARFAJA, N.; EL-TOHAMY, M. – **A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles and graphene oxide for the detection of tumor marker calcitonin.** New J. Chem. 41, 1 (2017), 11029-11035.
- [57] LEWANDROWSKI, K.; CHEN, A.; JANUZZI, J. – **Cardiac Markers for Myocardial Infarction: A Brief Review.** Pathology Patterns Reviews. 118, 1 (2002), S93–S99.
- [58] GARG, P. [et. al.] – **Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin.** Intern Emerg Med. 12, 1 (2017), 147–155.
- [59] HALL, C. – **NT-ProBNP: The Mechanism Behind the Marker.** Journal of Cardiac Failure. 11, 5 (2005), S81-S83.
- [60] HUNGERFORD, R.; MEIKLE, A. – **Adrenal Function** In: BISHOP, M. [et. al.]. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations. 6^a Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1, 458-476.
- [61] KATSU, Y.; BAKER, M. – **Subchapter 123D – Cortisol**, In: ANDO, H.; UKENA, K.; NAGATA, S. Handbook of Hormones. Japão: Academic Press, 2021, ISBN 9780128206492, 947-949.
- [62] TURPEINEN, U.; HÄMÄLÄINEN, E. – **Determination of cortisol in serum, saliva and urine.** Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 27, 6 (2013), 795-801.

- [63] ATLAS, S. – **The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition.** Journal of Managed Care Pharmacy. 13, 8 Supp B (2007), 9-20.
- [64] REISCH, N. [et. al.] – **Pheochromocytoma: presentation, diagnosis and treatment.** Journal of Hypertension. 24, 12 (2006), 2331-2339.
- [65] STEINER, D. – **Adventures with Insulin in the Islets of Langerhans.** J Biol Chem. 286, 20 (2011), 17399-421.
- [66] JONES, A.; HATTERSLEY, A. – **The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes.** Diabet. Med. 30, 7 (2013), 803-817.
- [67] BRIDGES, K.; PEARSON, H. – **Anemias and Other Red Cell Disorders.** 1ª Ed. Estados Unidos da América: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2007. ISBN 9780071419406.
- [68] NAZKI, F.; SAMEER, A.; GANAIE, B. – **Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases.** Gene. 533, 1 (2014), 11-20.
- [69] THOMAS, L. – **Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results.** 1ª Ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. ISBN 3-9805215-4-0.
- [70] SCAGLIONE, F.; PANZAVOLTA, G. – **Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing.** Xenobiotica. 44, 5 (2014), 480-488.
- [71] STABLER, S. – **Vitamin B12 Deficiency.** N Engl J Med. 368, 2 (2013), 149-160.
- [72] KNOVICH, M. [et. al.] – **Ferritin for the clinician.** Blood Rev. 23, 3 (2009), 95-104.
- [73] KHUNDMIRI, S.; MURRAY, R.; LEDERER, E. – **PTH and Vitamin D.** Comprehensive Physiology. 6, 2 (2016), 561-601.
- [74] JOHNSON, M. [et. al.] – **Relationship between ovarian steroids, gonadotrophins and relaxin during the menstrual cycle.** European Journal of Endocrinology. 129, 2 (1993), 121-125.
- [75] BEASTALL, G. [et. al.] – **Assays for Follicle Stimulating Hormone and Luteinising Hormone: Guidelines for the Provision of a Clinical Biochemistry Service.** Annals of Clinical Biochemistry. 24, 3 (1987), 246-262.
- [76] GRAHAM, J.; CLARKE, C. – **Physiological Action of Progesterone in Target Tissues.** Endocrine Reviews. 18, 4 (1997), 502-519.
- [77] KEEVIL, B.; ADAWAY, J. – **Assessment of free testosterone concentration.** The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 190, 0960-0760 (2019), 207-211.

- [78] SELBY, C. – **Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance.** *Ann Clin Biochem.* 27, 6 (1990), 532-541.
- [79] LEOWATTANA, W. – **DHEAS as a new diagnostic tool.** *Clinica Chimica Acta.* 341, 1-2 (2004), 1-15.
- [80] MANN, K.; SAILER, B.; HOERMANN, R. – **Clinical Use Of Hcg and hCG β Determinations.** *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 53, sup216 (1993), 97-104.
- [81] STENMAN, U.; ALFTHAN, H. – **Determination of human chorionic gonadotropin.** *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 27, 6 (2013), 783-793.
- [82] MATOS, C.; PERREIRA, M.; GUIMARÃES, J. – **A macroprolactinemia: da determinação laboratorial ao seu significado clínico.** *Acta Med Port.* 24, sup4 (2011), 929-938.
- [83] RUPP, M.; FEY, P. – **Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae.** *Drugs.* 63, 1 (2003), 353–365.
- [84] HITCHCOCK, C. [et. al.] – **Fluconazole Resistance in *Candida glabrata*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 37, 9 (1993), 1962-1965.
- [85] Direção-Geral da Saúde – **Norma 017/2011: Tratamento Conservador Médico da Insuficiência Renal Crónica Estádio 5.** Portugal: Direção-Geral da Saúde, 2011, 2012. [Acedido a 4 de junho de 2022]. Disponível na Internet: https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwixtd-JiZb4AhUlcxoKHbqpCL4QFnoECAYQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.dgs.pt%2Fdirectrizes-da-dgs%2Fnormas-e-circulares-normativas%2Fnorma-n-0172011-de-28092011-atualizada-a-14062012-jpg.aspx&usg=AOvVaw2x0GVc_bbjfRKZpe2YnnnE
- [86] STEIN, A; WILD, J. – **Kidney Failure Explained: Answers everything you always needed to know but were afraid to ask.** 2ª Ed. Reino Unido: Class Publishing, 2002. ISBN 9781859590706.
- [87] MALYSZKO, J.; MYSLIWIE, M. – **Hepcidin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease.** *Kidney Blood Press Res.* 30, 1 (2007), 15-30.
- [88] VARGHESE, N.; JOY, P. – **Microbiology Laboratory Manual.** 1ª Ed. India: Aromatic and Medicinal Plants Research Station, 2014.
- [89] STRUTHERS, K. – **Clinical Microbiology.** 2ª Ed. New York: CRC Press, 2017. ISBN 978-1-49878689-8.

- [90] PREECE, C. – **A study of the diagnosis, treatment and epidemiology of *Mycobacterium abscessus* in patients with cystic fibrosis.** Northumbria: Universidade de Northumbria, 2016. Tese de doutoramento.
- [91] MADIGAN, M. [et. al.] – **Microbiologia de Brook.** 14^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-298-6.
- [92] REY, L. – **Bases da Parasitologia Médica.** 3^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. ISBN 978-85-277-1580-5.

12. Anexos

Anexo I. Conceitos introdutórios de Microbiologia.

As bactérias são organismos procariontes, ou seja, não possuem uma membrana nuclear nem organelos intracelulares, tais como mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, característicos dos eucariontes. A coloração de Gram permite classificar as bactérias em dois grupos: bactérias de Gram negativo (rosas) e de Gram positivo (roxas), consoante com o tipo de parede celular bacteriana. As bactérias de Gram negativo possuem uma camada fina de peptidoglicano entre duas membranas celulares, sendo que a membrana externa contém um elevado teor lipídico. Enquanto as bactérias de Gram positivo apresentam uma parede celular espessa predominantemente constituída por peptidoglicano. (Figura 12). [88, 89]

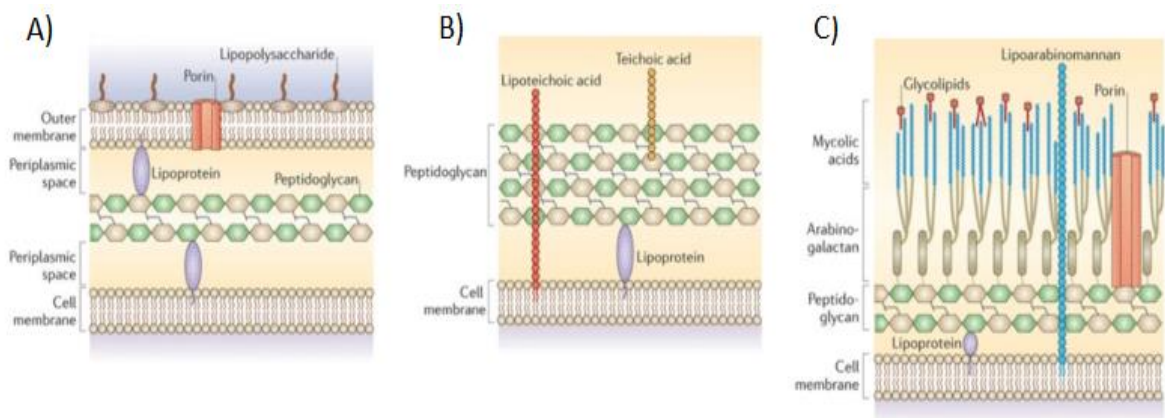


Figura 12. Representação da constituição da parede celular de bactérias de Gram negativo (A) Gram positivo (B) e micobactérias (C). [90]

Durante a coloração, o corante cristal violeta é adicionado e penetra no interior das bactérias, formando um complexo insolúvel na presença de Lugol. Mais tarde, aplica-se o diferenciador álcool/acetona, que solubiliza a membrana celular externa de bactérias de Gram negativo, deste modo criam-se poros de libertação de cristal violeta e há descoloração celular. No entanto, as bactérias de Gram positivo retêm este cristal devido à espessa camada celular e permanecem roxas em contacto com o diferenciador álcool/acetona. Por fim, adiciona-se o corante secundário (safranina) torna as bactérias de Gram negativo rosas. [88, 89]

O esfregaço, entre lâmina e lamela, sob coloração de Gram é observado na objetiva de 100x, com óleo de imersão, e é possível classificar a morfologia em esferas (cocos), bastonetes (bacilos), cocobacilos, espirais (espiroquetas) e vírgula (víbrio). Estes, por sua vez podem estar presentes em agrupamentos, como por exemplo de pares (diplobacilos e diplococos), cacho (estafilococos) e em fila (estreptococos e estreptobacilos). [89]

Porém, existem bactérias como os micoplasmas (por exemplo, *Mycoplasma hominis*) e ureaplasmas (por exemplo, *Ureaplasma urealyticum*) que não possuem parede celular, mas sim

uma membrana flexível e, portanto, não apresentam uma morfologia definida ao microscópio. Adicionalmente, existem as micobactérias que são bacilos com uma parede celular semelhante às bactérias de Gram positivo, por não possuírem membrana externa (Figura 12), contudo esta é bem mais espessa e cerosa devido ao elevado teor lipídico, nomeadamente em ácido micólico. Tal teor lipídico confere às micobactérias uma resistência álcool-ácido, que impede a sua coloração pela técnica de Gram. Assim, é necessário empregar a técnica de Ziehl-Neelsen nestes bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). [19]

Na técnica de Ziehl-Neelsen, uma mistura do corante vermelho fucsina com fenol é introduzida nas células por meio de um aquecimento lento (o fenol aumenta a absorção da fucsina nos lipídios). Após a lavagem com água destilada, a preparação é descorada com solução de álcool-ácido e todas as bactérias não BAAR perdem a sua coloração, sendo novamente coradas pelo azul-de-metileno. Como resultado as micobactérias são coradas a vermelho, enquanto os organismos não BAAR e fundo são corados de azul. [91]

Os fungos são organismos eucariontes e podem ser classificados em leveduras, fungos filamentosos e dimórficos (podem assumir ambas as morfologias). As leveduras são unicelulares e formam colónias redondas e mucosas, enquanto os fungos filamentosos são multicelulares com estruturas tubulares microscópicas denominadas de hifas, formando colónias algodoadas, lanosas, aveludadas, entre outras características. [18]

Os parasitas são seres eucariontes que apresentam diversas estruturas ao longo dos seus ciclos de vida complexos. Alguns parasitas são unicelulares (protozoários) enquanto outros são multicelulares (metazoários), porém todos apresentam como característica marcante, a dependência metabólica de um hospedeiro para sobreviver, geralmente causando doença no mesmo. [92]

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e as menores partículas infecciosas que existem (18 a 600nm), não podem ser cultivados em meios de cultura utilizados para bactérias e fungos, nem observados ao microscópio ótico. Em termos estruturais, os vírus são constituídos por um único tipo de ácido nucleico (ácido desoxirribonucleico – DNA ou ácido ribonucleico – RNA) e por uma cápsula proteica que envolve o genoma. Certos vírus são designados de envelopados, pois possuem uma membrana externa formada pela modificação da membrana plasmática da célula hospedeira, aquando da sua libertação para o espaço extracelular. [19]

Anexo 2. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Microbiologia.

Equipamento	Metodologia	Determinações Analíticas
Bactec 9240 BD	Fluorescência	Incubação de meios de cultura e detecção de crescimento microbiano
Bactec MGIT 960 BD		
VITEK-2 <i>Compact</i> , bioMérieux	Turbidimetria	Teste de suscetibilidade antimicrobiana automáticos
VITEK-2 <i>DensiCHEK</i> , bioMérieux	Densidade ótica	Medição de densidade de suspensões microbianas
MALDI-TOF-MS <i>Biotyper</i> , Bruker	MALDI-TOF-MS (Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz, acoplada a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo)	Identificação automática de microrganismos
<i>Aerospray Gram – Slide Stainer Cyto centrifuge</i>	Coloração de Gram automática de lâminas	-
<i>Aerospray TB – Slide Stainer Cyto centrifuge</i>	Coloração de Ziehl-Neelsen automática de lâminas	-
Estufa 5% CO ₂ 150i, Heracell	Incubação de meios de cultura	-
Estufas O ₂ , Mermmet		
Estufa O ₂ RI-150, Thermo Scientific		
<i>Ultrasafe 48, Faster</i>	Câmara de fluxo laminar nível II	-
<i>FluoroType MTB, Hain</i>	RT-PCR (<i>Real Time - Polymerase Chain Reaction</i>)	Deteção de sequências de nucleótidos do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Microscópio ótico	Observação de lâminas	-

Anexo 3. Equipamentos, metodologias e parâmetros da seção Hematologia.

Equipamento	Metodologia	Determinações Analíticas
Mindray BC-6800 Auto Hematology Analyzer	Tecnologia Volume, Condutividade e Scatter, Impedância, Espectrofotometria	Hemograma
VES MATIC CUBE 80	Westergren	Velocidade de sedimentação
D-100™ Hemoglobin Testing System	Cromatografia de troca iônica por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	Hemoglobina glicada (A _{1c})
VARIANT™ II HbA ₂ /HbA _{1c}		Separação de hemoglobinas (A ₀ , A ₂ , F, A _{1c} , S, C, D, E)
Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer	Espectrofotometria	Prova de fragilidade osmótica
ACLTOP 750 ^{CTS}	Coagulometria	Tempo de Protrombina (PT), Tempo de Trombina (TT), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), Doseamento de fibrinogênio, Tempo de veneno de víbora de Russel diluído (dRVVT), Silica Clotting Time (SCT) e Resistência à Proteína C Ativada (RPCA)
	Colorimetria	Antitrombina III e Atividade da proteína C
	Imunoturbidimetria	D-Dímeros e Proteína S livre

Anexo 4. Equipamentos, metodologias e parâmetros da subsecção Serologia.

Equipamento	Metodologia	Determinações Analíticas
Alinity i, Abbott	CLIA (Chemiluminescent Immuno Assay)	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma Gondii</i> , vírus da Rubéola, <i>Cytomegalovirus</i> , vírus Epstein-Barr, <i>Treponema pallidum</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e SARS-CoV-2
Maglumi 800, Snibe Diagnostic		Anticorpos anti-SARS-CoV-2, <i>Helicobacter pylori</i> , vírus Herpes Simplex e <i>Treponema pallidum</i>
AP22 Speedy IF, DAS	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	Interferão- γ em resposta a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (amostra: plasma); Anticorpos anti- <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Brucella</i> spp., <i>Chlamydomphila pneumonia</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Closteridium tetani</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Enterovirus</i> , <i>Parvovirus B19</i> , vírus da Parotidite, vírus <i>Varicella-Zoster</i> , vírus do Dengue e <i>Toxocara canis</i>
SD Biosensor F200	FIA (Fluorescent Immuno Assay)	Antigénios de <i>Legionella pneumophila</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> na urina
Técnica manual	Aglutinação (RPR – <i>Rapid Plasmin Reagin</i>)	Anticorpos não treponémicos (Reagina) no soro
	Aglutinação (VDRL – <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>)	Anticorpos não treponémicos (Reagina) no líquido cefalorraquidiano
	Aglutinação (<i>Brucella Micoagglutination Test</i> – BMAT e Rosa Bengala)	Anticorpos totais anti- <i>Brucella</i> spp.
Técnica manual	Hemaglutinação	Anticorpos totais anti- <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Fasciola hepatica</i>
	Imunocromatografia de fluxo lateral	Antigénios de <i>Helicobacter pylori</i> e <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhi (amostra: fezes); Antígeno de <i>Cryptococcus neoformans</i> ; Antígeno e Anticorpos anti-vírus do Dengue; Anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp., <i>Echinococcus granulosus</i> , <i>Leishmania</i> spp. e <i>Schistosoma</i> spp.

Anexo 5. Equipamentos da subsecção Biologia Molecular.

Equipamento	Descrição/Função
<i>KingFisher Apex, Thermo Scientific</i>	Sistema de extração de ácidos nucleicos
<i>EZI Advanced, QUIAGEN</i>	
<i>MagNA Pure Compact, Roche</i>	
<i>Andis 350, 3D Med</i>	
<i>QuantGene 9600, Bioer</i>	Termociclador de amplificação RT-PCR (<i>Real Time - Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>StepOne, Applied Biosystems</i>	
<i>QuantStudio 5, Applied Biosystems</i>	
<i>FluoroType MTB, Hain</i>	
<i>ELITE InGenius, ELITechGroup</i>	
<i>FilmArray, BioFire</i>	Sistema automático de extração e amplificação RT-PCR (<i>Real Time - Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>GeneXpert, Cepheid</i>	
<i>Liat, Cobas</i>	

Anexo 6. Amostras, metodologias e parâmetros da subsecção Biologia Molecular.

Infeção	Amostras	Metodologia
Respiratória	Expetoração, aspirado bronco-alveolar, secreções brônquicas, lavados bronco alveolares	Teste RT-PCR de 1ª linha para deteção de <i>Chlamyphila pneumoniae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Pneumocystis jiroveci</i> e SARS-CoV-2 Teste RT-PCR de 2ª linha Multiplex FilmArray <i>Pneumonia Panel plus</i>
	Exsudado nasofaríngeo (zaragatoa em meio de transporte)	Teste RT-PCR de 1ª linha para deteção de <i>Influenza A</i> , <i>Influenza B</i> e SARS-CoV-2 Teste RT-PCR de 2ª linha Multiplex FilmArray <i>Respiratory Panel 2.1 plus</i>
Neurológica	Líquido cefalorraquidiano (LCR)	Teste RT-PCR de 1ª linha para deteção de <i>Enterovirus</i> , vírus <i>Herpes Simplex</i> , vírus <i>Varicella-Zoster</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> Teste RT-PCR de 2ª linha para deteção de <i>Cytomegalovirus</i> , vírus do <i>Dengue</i> , vírus <i>Epstein-Barr</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , vírus <i>JC</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> Teste RT-PCR de 3ª linha Multiplex FilmArray <i>Meningitis/Encephalitis Panel</i>
Sistémica	Sangue	Teste RT-PCR para deteção de vírus <i>BK</i> , <i>Cytomegalovirus</i> , vírus do <i>Dengue</i> , vírus <i>Epstein-Barr</i> , vírus <i>Herpes Simplex</i> , <i>Leptospira</i> spp., <i>Parvovirus B19</i> , vírus <i>Varicella-Zoster</i> , <i>Zika virus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>
	1ª urina da manhã	Teste RT-PCR para deteção de vírus <i>BK</i> , <i>Cytomegalovirus</i> , <i>Leptospira</i> spp. e <i>Zika vírus</i>
-	Exsudado de vesícula	Teste RT-PCR para deteção de vírus <i>Herpes Simplex</i> e vírus <i>Varicella-Zoster</i>
-	Líquidos biológicos	Teste RT-PCR para deteção de <i>Cytomegalovirus</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Sexualmente transmissível	1ª urina da manhã	Teste RT-PCR para rastreio de <i>Chlamydia trachomatis</i>
	Exsudado uretral/cérvico-vaginal	Teste RT-PCR para deteção de <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Haemophilus ducreyi</i> , <i>Ureaplasma</i> spp., <i>Mycoplasma genitalium</i> e <i>Mycoplasma hominis</i>
	Exsudado de lesão venérea	Teste RT-PCR para deteção de <i>Treponema pallidum</i> e vírus <i>Herpes Simplex</i>
	Exsudado anal	Teste RT-PCR para deteção de <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Treponema pallidum</i> e vírus <i>Herpes Simplex</i>
Gastrointestinal	Biópsias	Teste RT-PCR para deteção de <i>Cytomegalovirus</i> e <i>Helicobacter pylori</i>
	Fezes	Teste RT-PCR para deteção de genes produtores de toxinas de <i>Clostridium difficile</i>
Resistências bacterianas	Exsudado retal	Teste RT-PCR para deteção de genes produtores de carbapenemases

Anexo 7. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Endocrinologia.

Painel	Determinações Analíticas	Amostra	Equipamento	Método
Função tiroideia	Tiroxina livre	soro	COBAS 8000	ECLIA
	Triiodotironina livre			
	Tiroxina			
	Triiodotironina			
	Tirotropina (TSH)			
	Anticorpos anti tiroglobulina			
	Anticorpos anti-peroxidase específica da tiróide			
	Anticorpos anti-recetor da TSH			
	Tiroglobulina			
	Calcitonina			
Hormonas da fertilidade	Progesterona	soro	COBAS 8000	ECLIA
	Testosterona total			
	Hormona Folículo-Estimulante			
	Hormona Luteinizante			
	Prolactina			
	17 β -estradiol			
	Hormona Gonadotrópica Coriónica Humana			
	Sulfato de Dehidroepiandrosterona			
	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>			
	Testosterona livre	Maglumi 600	CLIA	
Estudo de anemias	Folato	soro	COBAS 8000	ECLIA
	Vitamina B12			
	Ferritina		UniCel DXI 800	CLIA
	Eritropoietina			
	Anticorpo anti-Fator Intrínseco			
Marcadores tumorais	Antigénio Específico da Próstata total e livre	soro	COBAS 8000	ECLIA
	Antigénio Carcino Embrionário			
	Alfa I-fetoproteína			
	Antigénio Carboidrato 125			
	Antigénio Carboidrato 19-9			
	Antigénio Carboidrato 15-3			
	Antigénio Carboidrato 72-4			
	Enolase Neuro-Específica			
Citoqueratina fração 21-1				
Estudo de diabetes mellitus	Insulina	soro	COBAS 8000	ECLIA
	Peptídeo C	soro		
		urina 24h		
Marcadores cardíacos	Troponina T de alta sensibilidade	soro	COBAS 8000	ECLIA
	Mioglobina			
	NT-proBNP			
Metabolismo ósseo	Paratormona	plasma	COBAS 8000	ECLIA
	Vitamina D total	soro		

Painel	Determinações Analíticas	Amostra	Equipamento	Método
Função suprarrenal e marcadores de hipertensão secundária	Norepinefrina	urina 24h	I260 <i>Infinity</i>	HPLC
	Epinefrina			
	Dopamina			
	Ácido Vanilmandélico			
	Ácido Homovanílico			
	Ácido 5-hidroxi-indolacético			
	Metanefrinas			
	Normanefrinas			
	3-Metoxitiramina			
	Renina	plasma	Maglumi 600	CLIA
	Aldosterona	urina 24h		
		soro		
	Cortisol	urina 24h	UniCel DXI 800	ECLIA
soro		COBAS 8000	CLIA	
Hormona Adrenocorticotrófica	plasma	COBAS 8000	ECLIA	

Anexo 8. Equipamentos, metodologias e parâmetros da seção Bioquímica.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros analíticos
Cobas c 702	Colorimetria	Albumina, α -amilase pancreática, bilirrubina (direta, indireta e total), cálcio, creatinina, ferro, magnésio, fósforo inorgânico e proteínas totais séricas
	Colorimetria Enzimática	Fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, amônia, aspartato aminotransferase, colesterol (total, HDL e LDL), creatinina cinase total, γ -glutamil-transferase, glicose, lactato, lactato desidrogenase, lipase pancreática, triglicéridos, ácido úrico, ureia e homocisteína
	Imunoturbidimetria	β 2-microglobulina, proteína C reativa, transferrina, capacidade de fixação do ferro total e saturação de transferrina
	Turbidimetria	Proteínas totais urinárias
	Ultravioleta imunológico	Creatinina cinase MB
Cobas ISE	Potenciometria indireta	Sódio, cloreto, potássio e osmolaridade
Aution Max Ax-4030	Colorimetria, turbidimetria, refratometria e tiras de reação/refletância	Urina Tipo II (cor, turvação, densidade, pH, glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogênio, corpos cetônicos, nitritos, hemoglobina e leucócitos)
SediMax 2	Microscopia ótica	Sedimento urinário (eritrócitos, leucócitos, cilindros hialinos, cilindros patológicos, células epiteliais, células pequenas redondas, bactérias, leveduras, cristais e muco)
HM-Jack Arc	Imunoturbidimetria	Sangue Oculto (hemoglobina fecal)

Anexo 9. Equipamentos, metodologias e parâmetros da secção Imunologia.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros analíticos	Patologias
<i>ImmunoCap 250, Thermo Scientific</i>	Imunoensaio fluoro-enzimático	Anticorpos IgE totais	Alergias e hipersensibilidades
		Anticorpos IgE específicos	
		Triptase	Reação anafilática e mastocitose
<i>Atellica NEPH 630 System, Siemens Healthineers</i>	Imunonefimetria	Anticorpos IgG totais, IgM totais, IgA totais, cadeias leves kappa, cadeias leves lambda, razão cadeias leves kappa/lambda, cadeias leves livres kappa, cadeias leves livres lambda, razão cadeias leves livres kappa/lambda	Screening de doenças autoimunes, imunodeficiências e gamapatias
		Fator reumatoide	Artrite reumatoide
		C3 e C4	Estudo do sistema de complemento
		Alfa I anti-tripsina, ceruloplasmina, haptoglobulina e beta2 microglobulina	Estudo de proteínas séricas
<i>V8 Nexus, helena Biosciences Europe</i>	Eletroforese capilar	Eletroforese de proteínas séricas (Proteinograma) e imunodeslocamento	Screening de gamapatias
Técnica manual	Imunocromatografia competitiva	Proteína urinária de Bence-Jones	Screen de gamapatias
<i>Zenit Pro, Menarini Diagnostics</i>	IFA (<i>Indirect Fluorescent Antibody</i>)	ANA, ANCA, AMA	Screening de doenças autoimunes
<i>Zenit ra, Menarini Diagnostics</i>	CLIA (<i>Chemiluminescent Immuno Assay</i>)	Anticorpos anti-ENA (SS-A, SS-B, Sm, UI-snRNP, Scl-70 e Jo-1)	Screening de doenças autoimunes
		Anticorpos anti-dsDNA	
		Anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico	Artrite reumatoide
		Calprotectina fecal	Doenças inflamatórias intestinais
		Anticorpos IgG e IgA anti-gliadina deaminada	Doença celíaca
		Anticorpos IgG e IgA anti-transglutaminase	
		Anticorpos IgG e IgM anti-B ₂ -Glicoproteína I	Síndrome anti-fosfolípídica e lupus eritematoso sistémico
		Anticorpos IgG e IgM anti-cardiolipina	
Anticorpos anti-PR3, MPO e MBG	Screen de doenças autoimunes		

Equipamento	Metodologia	Parâmetros analíticos	Patologias
Zenit UP, Menarini Diagnostics	ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	Anticorpos IgA e IgG ASCA	Doenças inflamatórias intestinais
		Anticorpos IgG anti-LC-I e SLA/LP	Hepatite autoimune e cirrose biliar primária
		Anticorpos anti-C1q	Glomerulonefrite associada a lupus eritematoso sistêmico
EUROBlotMaster, EUROIMMUN	Immunoblot	Anticorpos IgG anti-Mi-2, Ku, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl-100, Jo-I, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleosomas, histonas, Prot.-P-rib., AMA-M2 e DFS70	Screening de doenças autoimunes
EUROBlotMaster, EUROIMMUN	Immunoblot	Anticorpos IgG anti-Scl-70, CENP A, CENP B, RPI I, RPI55, fibrilarina, NOR90, Th/To, PM-Scl-100, PM-Scl-75, Ku, PDGFR e Ro-52	Esclerose sistêmica
		Anticorpos IgG anti-Mi-2a, Mi-2 β , TIF1 γ , MDA5, NXP2, SAEI, Ku, PM-Scl-100, PM-Scl-75, Jo-I, SRP, PL-7, EJ, OJ, Ro-52 e cN-1A	Miopatia inflamatória autoimune
		Anticorpos IgG anti-AMA-M2, M2-3E, Sp100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP, SS-A, Ro-52, Scl-70, CENP A/B e PGDH	Hepatite autoimune e cirrose biliar primária

C3 – Componente 3 do complemento; C4 – Componente 4 do complemento; ANA – Anticorpos antinucleares; ANCA – Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo; AMA – Anticorpos anti-mitocôndria; ENA – Antígenos nucleares extraíveis; SS-A – Antígeno A de síndrome de Sjögren; SS-B – Antígeno B de síndrome de Sjögren; Sm – Antígeno Smith; U1-snRNP – Componente U1 da ribonucleoproteína nuclear pequena; Scl – Escleroderma; Jo-I – Histidil-ácido ribonucleico de transferência; dsDNA – Ácido desoxirribonucleico de dupla cadeia; PR3 – Proteinase 3; MPO – Mieloperoxidase; MBG – Membrana basal glomerular; ASCA – Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*; LC-I – Antígeno citosólico de tipo I do fígado; SLA/LP – Antígeno hepático solúvel/antígeno fígado-pâncreas; C1q – Fragmento q do componente I do complemento; Mi-2 – Antígeno miosite; PM – Poliomiosite; CENP B – Proteína B do centrômero; PCNA – Antígeno nuclear de células proliferadoras; Prot.-P-rib. – Proteína P ribossomal; DFS70 – Anticorpos *Dense fine speckled*; CENP A – Proteína A do centrômero; RP – Polimerase 3 de ácido ribonucleico; PDGFR – Recetor para o fator de crescimento derivado de plaquetas; SAEI – Subunidade I da enzima de ativação do modificador pequeno semelhante à ubiquitina; SRP – Partículas de reconhecimento de sinal; PL-7 – Treonina-ácido ribonucleico de transferência sintase; EJ – Glicil-ácido ribonucleico de transferência sintase; OJ – Isoleucil-ácido ribonucleico de transferência sintase; cN-1A – 5'-nucleotidase citosólica 1A; PML – Leucemia promielocítica; gp210 – Glicoproteína 210; LKM-1 – Anticorpos anti-microsoma de rim e fígado; PGDH – hidroxiprostaglandina desidrogenase.

Anexo 10. Parâmetros de alergias e hipersensibilidade da secção Imunologia.

<i>Multirast</i> de alergénio	
<i>Multirast</i> alimentar em crianças com idade <4 anos	Amendoim, bacalhau, clara de ovo, grão de soja, leite e trigo
<i>Multirast</i> de cereais	Aveia, milho, semente de sésamo, trigo, e trigo mourisco
<i>Multirast</i> de árvores	Acácia, eucalipto, melaleuca, oliveira, pinheiro silvestre e salgueiro
<i>Multirast</i> de gramíneas	Panasco, sargasso bravo, azevém, rabo de gato e erva de febra
<i>Multirast</i> de ervas infestantes	Erva de Santiago, artemísia verdadeira, corrijo, pé de ganso e soda
<i>Multirast</i> de fungos	<i>Penicilium notatum</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Helminthosporium</i> spp.
<i>Multirast Phadiatop</i> inalante	Ácaros, fungos, barata, gramíneas, árvores, ervas infestantes, pêlo e caspa de cão e gato
Alergénios individuais	
Alergénios individuais dos <i>Multirast</i> alimentar em crianças com idade inferior a quatro anos, cereais, árvores, gramíneas, ervas infestantes, fungos e <i>Phadiatop</i> inalante	
Alergénios dos cereais para além do <i>Multirast</i> de cereais (arroz, centeio ou cevada)	
Alergénios da carne de porco, vaca ou carneiro	
Alergénios do ovo (gema, clara, ovoalbumina ou ovomucoíde)	
Alergénios do leite (alfa-lactoalbumina, beta-lactoalbumina ou caseína)	
Alergénios do glúten	
Alergénios dos frutos (maçã, kiwi, pêsego, laranja ou ameixa)	
Alergénios dos frutos secos (amêndoa, amendoim, avelã, noz ou pinhões)	
Alergénios do pescado (atum, bacalhau, salmão, carapau, cavala ou pescada)	
Alergénios do marisco (camarão, mexilhão azul, ameijoia ou caranguejo)	
Alergénios dos moluscos (lapa, lula ou polvo)	
Alergénios dos ácaros (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Dermatophagoides farinae</i> ou <i>Blomia tropicalis</i>)	
Alergénios do pó de casa	
Alergénios dos parasitas (<i>Anisakis</i> spp. ou <i>Ascaris</i> spp.)	
Alergénios do látex	
Alergénios das árvores para além do <i>Multirast</i> de árvores (castanheiro ou cipreste)	
Alergénios dos insetos (abelha, vespa ou barata)	
Alergénios dos fármacos (penicilina G, penicilina V, ampicilina ou amoxicilina)	