

Miriam do Carmo Marcondes Rocha

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo  
Dr. António Ferreira Neves e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Relatório de Estágio**

### **Mestrado em Análises Clínicas**

**Trabalho realizado por:** Miriam do Carmo Marcondes Rocha

**Orientador externo:** Dr. António Ferreira Neves

**Orientador interno:** Professor Doutor José Barata Custódio

**Local de estágio:** Laboratório Médico de Análises Clínicas AVELAB

**Período de estágio:** dezembro de 2014 a junho de 2015

**Áreas:** Microbiologia, Imunologia, Hematologia e Bioquímica



## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pela força e paciência nesta nova fase,  
À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra,  
A toda a equipa do Laboratório AVELAB pelo acompanhamento  
pontual e competente.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram  
para a realização deste relatório de estágio.



## Índice

Abreviaturas.....	9
Resumo.....	11
<i>Abstract</i> .....	11
I. Introdução.....	13
II. Caracterização do laboratório de estágio.....	14
III. Processamento das amostras biológicas.....	15
1. Fase pré-analítica.....	15
2. Fase analítica.....	16
3. Fase pós-analítica.....	16
IV. Gestão do controlo de qualidade.....	17
1. Controlo de qualidade interno.....	17
2. Controlo de qualidade externo.....	17
V. Hematologia.....	18
VI. Bioquímica.....	18
VII. Imunologia.....	19
1. Técnicas Manuais.....	19
1.1. Testes VDRL e TPHA.....	19
1.2. Ensaio de aglutinação direta.....	20
1.2.1. Reação de Widal.....	20
1.2.2. Reação de Weil-Felix.....	21
1.2.3. Reação de Wright.....	21
1.3. Reação de Waaler-Rose.....	21
1.4. Imunocromatografia.....	22
2. Equipamentos.....	22
3. Marcadores de Anemia.....	24
3.1. Vitamina B12.....	24
3.2. Folato.....	24
4. Marcadores cardíacos.....	24
4.1. Troponina I.....	25
4.2. Mioglobina.....	25
5. Estudo da função endócrina.....	25
5.1. Diabetes <i>mellitus</i> .....	26

5.1.1.	Insulina e peptídeo C .....	26
5.2.	Endocrinologia reprodutiva .....	27
5.2.1.	Hormona Folículo-Estimulante e Hormona Luteinizante .....	27
5.2.2.	Estradiol .....	29
5.2.3.	Progesterona .....	29
5.2.4.	Testosterona .....	29
5.2.5.	Dehidroepiandrosterona-Sulfato .....	30
5.2.6.	Gonadotrofina Coriônica Humana .....	30
5.2.7.	Prolactina .....	30
5.3.	Função do Córtex Adrenal .....	31
5.3.1.	Hormona Adrenocorticotrófica .....	31
5.3.2.	Cortisol .....	32
5.4.	Função da tiróide .....	32
5.4.1.	Hormona Tireotrófica .....	32
5.4.2.	Tiroxina e Tri-iodotironina .....	33
5.5.	Hormonas do metabolismo ósseo .....	33
5.5.1.	Vitamina D Total .....	34
5.5.2.	Paratormona .....	34
6.	Marcadores tumorais .....	35
6.1.	Antigénio específico da próstata total .....	35
6.2.	Antigénio específico da próstata livre .....	35
6.3.	$\alpha$ -Fetoproteína .....	36
6.4.	Antigénio carcinoembrionário .....	36
6.5.	CA 15-3 .....	36
6.6.	CA 125 .....	37
6.7.	CA 19-9 .....	37
6.8.	$\beta$ -2-microglobulina .....	38
7.	Serologia .....	38
7.1.	Vírus Epstein-Barr .....	39
7.2.	Citomegalovírus .....	39
7.3.	Vírus da Rubéola .....	40
7.4.	Vírus da Hepatite A .....	40
7.5.	Vírus da Hepatite B .....	40
7.6.	Vírus da Hepatite C .....	42
7.7.	Vírus da Imunodeficiência Humana .....	42

7.8.	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	43
7.9.	<i>Helicobacter pylori</i> .....	43
8.	Alergias.....	44
8.1.	IgE total e IgE específica .....	44
9.	Autoimunidade.....	45
9.1.	Doenças reumáticas sistémicas.....	45
9.1.1.	Anticorpos antinucleares .....	45
9.1.2.	Anticorpos anti-SS-B/La e anti-SS-A/Ro .....	46
9.1.3.	Anticorpos anti-DNA de dupla cadeia .....	47
9.1.4.	Anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico IgG .....	47
9.1.5.	Anticorpos anti-cardiolipina IgG e IgM.....	47
9.2.	Doença Celíaca .....	47
9.2.1.	Anticorpos anti-transglutaminase tecidual IgG e IgA .....	48
9.3.	Doenças da tiróide .....	48
9.3.1.	Anticorpos anti-peroxidase da tiróide.....	48
9.3.2.	Anticorpos anti-tiroglobulina .....	48
VIII.	Microbiologia .....	49
1.	Exame microscópico direto .....	49
1.1.	Exame a fresco .....	49
1.2.	Coloração de Gram.....	49
1.3.	Coloração de Zielh-Neelsen.....	50
1.4.	Método do hidróxido de potássio.....	50
2.	Meios de Cultura .....	50
3.	Provas de identificação .....	52
4.	Antibiogramas .....	53
5.	Urinas .....	54
5.1.	Colheita .....	54
5.2.	Urianálise – Aution MAX AX-4030.....	55
5.3.	Exame direto e cultural .....	56
5.4.	Interpretação dos resultados .....	56
6.	Fezes.....	57
6.1.	Colheita .....	57
6.2.	Adenovírus e Rotavírus .....	58
6.3.	Exame bacteriológico e micológico das fezes .....	58
6.3.1.	Interpretação dos resultados .....	58



7.	Exsudados uretrais, vaginais e retais.....	58
7.1.	Colheita.....	59
7.2.	Exame direto e cultural .....	59
7.3.	Interpretação dos resultados .....	60
8.	Expetoração.....	60
8.1.	Colheita.....	61
8.2.	Exame direto e cultural .....	61
8.3.	Interpretação dos resultados .....	62
9.	Exsudados faríngeos e nasais .....	63
9.1.	Colheita.....	63
9.2.	Exame direto e cultural .....	63
9.3.	Interpretação dos resultados .....	64
10.	Exsudados auriculares .....	64
10.1.	Colheita.....	65
10.2.	Exame direto e cultural .....	65
10.3.	Interpretação dos dados.....	65
11.	Exsudados oculares .....	65
11.1.	Colheita.....	66
11.2.	Exame direto e cultural .....	67
11.3.	Interpretação dos resultados .....	67
12.	Exsudado purulento: ferida e pus de abscesso.....	67
12.1.	Colheita.....	67
12.2.	Exame direto e cultural .....	68
12.3.	Interpretação dos resultados .....	68
13.	Hemoculturas .....	68
13.1.	Colheita.....	69
13.2.	Método manual .....	69
13.3.	Interpretação dos resultados .....	70
14.	Pesquisa micológica em cabelos, unhas e pele .....	70
14.1.	Colheita.....	71
14.2.	Exame direto e cultura .....	71
14.3.	Interpretação dos resultados .....	71
IX.	Conclusão .....	72
X.	Referências bibliográficas.....	73
	Anexo.....	75

## Abreviaturas

1,25(OH)<sub>2</sub>D – 1,25-di-hidroxivitamina D

25(OH)D – 25-hidroxivitamina D

β<sub>2</sub>M – β-2-microglobulina

ACTH – Hormona adrenocorticotrófica

AFP – α-Fetoproteína

Anti-CCP – Anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico

Anti-dsDNA – Anticorpos anti-DNA de dupla cadeia

Anti-HBc – Anticorpos contra o antígeno do core do vírus da hepatite B

Anti-HBe – Anticorpos contra o antígeno “e” do vírus da hepatite B

Anti-HBs – Anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

Anti-TG – Anticorpos anti-tiroglobulina

Anti-TPO – Anticorpos anti-peroxidase da tireóide

CEA – Antígeno carcinoembrionário

CLED – Cistina-Lactose-Deficiente de Eletrólitos

CMV – Citomegalovírus

CpS – Peptídeo C

CQ – Controlo de qualidade

CQE – Controlo de qualidade externo

CQI – Controlo de qualidade interno

CRH – Hormona libertadora da corticotrofina

DHEA-SO<sub>4</sub> – Dehidroepiandrosterona-Sulfato

EBV – Vírus Epstein-Barr

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ENA – Antígenos nucleares extraíveis

fPSA – Antígeno específico da próstata livre

FR – Fator reumatoide

FSH – Hormona folículo-estimulante

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas

HAV – Vírus da Hepatite A

HBeAg – Antígeno “e” do vírus da hepatite B

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBP – Hiperplasia benigna da próstata

HBV – Vírus da Hepatite B  
HCV – Vírus da Hepatite C  
hCG – Gonadotrofina coriônica humana  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
HLA – Antígeno leucocitário humano  
IgA – Imunoglobulina A  
IgE – Imunoglobulina E  
IgG – Imunoglobulina G  
IgM – Imunoglobulina M  
KOH – Hidróxido de potássio  
LH – Hormona luteinizante  
PRL – Prolactina  
PSA – Antígeno específico da próstata  
PTH – Paratormona  
SHBG – Globulina de ligação das hormonas sexuais  
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
STRB – ChromID Strepto B  
T3 – Tri-iodotironina  
T4 – Tiroxina  
Tnl – Troponina I  
Toxo – *Toxoplasma gondii*  
TPHA – *Treponema pallidum Hemagglutination Assay*  
TSH – Hormona tireotrófica  
VDRL – *Venereal Disease Research Laboratory*

## **Resumo**

Este relatório de estágio do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia pretende descrever as atividades desenvolvidas ao longo do meu estágio no Laboratório AVELAB.

O meu estágio envolveu as valências de Microbiologia, Imunologia, Hematologia e Bioquímica. As áreas escolhidas para desenvolver no presente relatório foram Imunologia e Microbiologia. O relatório descreve a significância clínica dos diferentes testes, a interpretação dos resultados e indica os métodos utilizados nas áreas escolhidas.

## **Abstract**

*This internship report for the Clinical Analysis Masters of Pharmacy Faculty intends to describe the activities developed during my internship in AVELAB laboratory.*

*My stage involved the valences of Microbiology, Immunology, Hematology and Biochemistry. The areas chosen to develop in this report were Immunology and Microbiology. It describes the clinical significance of the different tests, the interpretation of results and indicate the methods used in the chosen areas.*



## **I. Introdução**

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas assume uma clara importância, proporcionando uma ligação entre a formação académica e a realidade profissional. Este permite uma componente laboratorial efetiva e elevada, conferindo aptidão para a realização e validação de técnicas laboratoriais aplicadas à prevenção, diagnóstico e monitorização da doença, além do desenvolvimento de competências profissionais.

Este relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o meu estágio e aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos no Mestrado em Análises Clínicas. Realizei o estágio no Laboratório Médico de Análises Clínicas AVELAB em Aveiro, sob a orientação do Dr. António Ferreira Neves, especialista pela Ordem dos Farmacêuticos, o qual, juntamente com toda uma equipa inigualável, contribuíram para a minha formação e desenvolvimento profissional, através dos seus ensinamentos e conselhos.

O estágio decorreu durante um período de 6 meses e contemplou as valências de Hematologia, Imunologia, Bioquímica e Microbiologia. Ao longo do estágio fui desempenhando diversas tarefas nestas áreas, adquirindo autonomia e aptidões para o exercício profissional.

Este relatório tem como objetivo a descrição e apresentação do trabalho que realizei como estagiária, caracterização do funcionamento do laboratório e do nosso papel enquanto agentes de saúde, através da realização de exames e testes em produtos biológicos, com o objetivo final de auxiliar no diagnóstico das patologias. As áreas escolhidas para aprofundar neste relatório foram a Imunologia e a Microbiologia.

## **II. Caracterização do laboratório de estágio**

O Laboratório AVELAB oferece comodidade para os utilizadores e condições de trabalho para os seus colaboradores, além de estar preparado para receber tecnologias modernas e garantir a qualidade aos seus utentes e médicos prescritores.

A direção técnica do laboratório é constituída pelos farmacêuticos especialistas Dr. António Ferreira Neves e Dra. Irene Sá e pelos médicos especialistas Dr. Alberto Ferreira Neves, Dr. Américo Freitas, Dr. António Rodrigues e Dra. Teresa Raposo.

O laboratório central presta serviços à comunidade no campo das análises clínicas, em áreas como a Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia. Este é constituído por uma sala de receção de utentes, quatro salas de colheitas, sala de triagem das amostras, áreas administrativas, gabinetes de validação e pelos diferentes laboratórios das áreas referidas. O seu horário de funcionamento nos dias úteis é das 7:30 às 19:00 horas e aos sábados das 8:00 às 13:00 horas.

Além do laboratório central, o AVELAB tem muitos postos de colheita distribuídos por vários concelhos da região centro, de forma a servir o maior número de utentes, nomeadamente aqueles com maiores dificuldades de acesso a serviços de saúde centrais. Também é de referir que a colheita de amostras pode ser realizada no domicílio, após marcação prévia. O laboratório efetua ainda análises para hospitais e clínicas privadas, lares de idosos e medicina do trabalho. As amostras são depois transportadas para o laboratório central em arcas refrigeradas, com o melhor acondicionamento possível.

O fluxo médio diário de utentes é cerca de 700. O laboratório contém modernos equipamentos automatizados que permitem a análise simultânea de um elevado número de amostras, com eficácia e eficiência. Na tabela I encontram-se resumidos os equipamentos automatizados utilizados no laboratório.

Além destes equipamentos automatizados, o laboratório possui vários frigoríficos e congeladores, nos diferentes sectores, onde são preservados os reagentes, controlos e calibradores que necessitam de ser conservados a baixa temperatura. Também possui outros equipamentos necessários para a realização das tarefas diárias, como por exemplo, centrífugas, estufas e microscópios óticos.

Os serviços encontram-se informatizados, possuindo uma rede de computadores ligados diretamente aos aparelhos. O programa informático é o Appolo 3 e permite o controlo do processo analítico, desde a entrada dos pedidos de análises no sistema até à emissão dos boletins de resultados.

**Tabela I** – Equipamentos automatizados utilizados no laboratório AVELAB.

<b>Área</b>	<b>Equipamento</b>
Microbiologia	- Aution Max AX-4030 (2 equipamentos)
Imunologia/Endocrinologia	- IMMULITE 2000
	- ADVIA Centaur XP (2 equipamentos)
	- Phadia 250
	- Zenit SP
Hematologia	- BCS
	- Sysmex CA-I500
	- Sysmex XE-2100
	- Sysmex XT-2000i
	- ADAMS A1c HA-8180
	- ADAMS A1c HA-8160
Bioquímica	- StaRRSed Auto-Compact
	- Olympus AU2700 (2 equipamentos)
	- Capillarys Sebia 2

### III. Processamento das amostras biológicas

Todo processo de análise das amostras engloba 3 fases, a pré-analítica, a analítica e pós-analítica. As diferentes fases analíticas devem ser muito bem controladas para evitar que ocorram erros e assegurar a qualidade do laboratório. Algumas medidas podem ajudar a reduzir os erros a um mínimo, como, por exemplo, uma formação adequada dos técnicos, a utilização de códigos de barras nas amostras, a implementação de um sistema informático no laboratório, a adoção de procedimentos padronizados e participação em programas de avaliação externa da qualidade.<sup>1,2</sup>

#### I. Fase pré-analítica

A fase pré-analítica refere-se a todas as etapas que ocorrem antes de uma amostra ser analisada.<sup>3</sup>

Na receção do laboratório AVELAB é realizado o atendimento dos utentes e os seus pedidos de análise são registados no sistema informático, sendo atribuído a cada utente um número de processo clínico. Às amostras é gerado um código com um número e duas letras que correspondem ao local da colheita ou da entrega da amostra, juntamente com o respetivo código de barras, sendo associado ao registo de cada utente.



Seguidamente, o utente é orientado e preparado para a colheita da amostra. Depois de colhidas, as amostras são triadas e distribuídas pelos diferentes sectores para serem devidamente analisadas. Algumas amostras requerem um pré-tratamento, como por exemplo, as amostras de soro destinadas as áreas de Bioquímica e de Imunologia/Endocrinologia devem ser primeiramente centrifugadas.

Os erros mais comuns ocorrem na fase pré-analítica, influenciando os resultados dos utentes e os custos. Estes podem ser devidos ao preenchimento incompleto dos dados da requisição, uma má colheita (hemólise, coagulação, volume insuficiente, etc.), recipiente inadequado, erros na rotulagem, tempo de transporte prolongado ou centrifugação incorreta (tempo e/ou velocidade).<sup>1,2,3</sup>

## **2. Fase analítica**

A análise das amostras pode ser efetuada em equipamentos automatizados e/ou por técnicas manuais. Os equipamentos são preparados diariamente, no que respeita a reagentes, calibradores e controlos, de modo a trabalharem com eficiência e qualidade.

No caso de haver impossibilidade de realizar algum teste ou análise, as amostras em questão são encaminhadas para os laboratórios Ambar ou Cerba, localizados em Barcelona e com os quais o laboratório AVELAB tem subcontratos. As amostras são acondicionadas devidamente, respeitando os protocolos, de modo a serem enviadas com segurança, tendo em atenção a adequada termoestabilização, as características da amostra, da análise a realizar, do tempo e à distância.<sup>4</sup>

A automatização, a formação dos técnicos do laboratório e adoção de programas de controlo de qualidade (CQ) permite o declínio dos erros analíticos. Os erros que ocorrem nesta fase podem ser sistémicos, devidos ao mau funcionamento do equipamento e à não conformidade com o controlo de qualidade interno. Ou também podem ser devidos a erros aleatórios, resultantes de outros problemas, como por exemplo, coágulos de fibrina, volumes de amostra insuficiente e contaminação dos reagentes.<sup>1,2</sup>

## **3. Fase pós-analítica**

Após o processo analítico, os resultados são dispostos por via informática e podem ser comparados com resultados anteriores, caso existam, verificando a sua coerência. O valor obtido deve ser submetido a um processo de avaliação pós-analítico de duas etapas: exatidão analítica e significância clínica. Depois de validados, primeiramente pelo pessoal técnico que executou a análise e, posteriormente, por um especialista, o boletim do utente pode ser emitido.<sup>3,4</sup>

Nesta fase podem surgir erros imprevistos, como a inserção manual de resultados no sistema informático ou validação errada dos dados analíticos.<sup>1,2</sup>

Depois de analisadas, as amostras são armazenadas em locais apropriados com temperaturas que permitam a sua conservação, até a eliminação segura destas.

#### **IV. Gestão do controlo de qualidade**

O laboratório AVELAB demonstra a preocupação na melhoria contínua da qualidade, exatidão e fiabilidade dos resultados. Assim sendo, submete-se a dois sistemas de CQ: o controlo de qualidade interno (CQI) e o controlo de qualidade externo (CQE).

##### **1. Controlo de qualidade interno**

O CQI consiste num conjunto de procedimentos postos em prática no laboratório, com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas. Este é indispensável para a deteção de anomalias, avaliação de erros e sua imediata correção.<sup>4</sup>

Os controlos internos devem ser sempre processados antes de se testarem as amostras ou quando é efetuada uma mudança no lote de reagentes. Os controlos podem ter dois ou três níveis diferentes e os resultados expressam-se numericamente e graficamente. Os valores obtidos podem ter até um desvio padrão máximo de +/- 2 do valor médio que seria ideal obter e as cartas de controlo devem ser analisadas segundo as regras de Westgard. Se os resultados do CQ estiverem fora dos valores estabelecidos, então devem ser aplicadas medidas corretivas, através da calibração ou de outra natureza técnica. Seguidamente repete-se a análise e se o valor do controlo estiver em conformidade, as amostras podem ser analisadas.

##### **2. Controlo de qualidade externo**

O CQE corresponde à avaliação, por um organismo exterior, da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório.<sup>4</sup>

Assim, para além de possuir controlos internos, o laboratório AVELAB participa regularmente em programas de avaliação externa da qualidade, nomeadamente o “United Kingdom National External Quality Assessment Service” (UK NEQAS) e o “Randox International Quality Assessment Scheme” (RIQAS). Os controlos enviados para serem testados são tratados como uma amostra normal, pois o seu conteúdo apresenta características desconhecidas. Os resultados obtidos são depois reportados para serem

analisados e comparados com os obtidos por outros participantes. Caso o resultado obtido não se encontre em conformidade é então investigada a possível causa, procedendo-se à respetiva correção. Os sectores de Microbiologia e Imunologia/Endocrinologia participam em ambos os programas.

O laboratório AVELAB encontra-se certificado de acordo com a Norma NP EN ISO 9001:2008, pela Bureau Veritas Certification. A certificação inclui a realização de auditorias externas e ensaios, de modo a verificar que o laboratório está em conformidade com os requisitos estabelecidos.

## **V. Hematologia**

A Hematologia é uma área onde são estudadas as células do sangue periférico, os seus precursores, a velocidade de sedimentação e o processo de coagulação. As análises podem ser realizadas em sangue total colhido para tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou plasma obtido do sangue colhido para tubos com citrato de sódio.

Nesta área, como estagiária pude integrar-me na dinâmica de trabalho e processar as amostras nos equipamentos automáticos para a determinação dos parâmetros hematológicos. Além disso, realizei algumas atividades manuais, tais como, preparação e a observação dos esfregaços sanguíneos, determinação dos grupos sanguíneos e a realização do teste de Coombs direto e indireto. Na interpretação e validação dos resultados obtidos, observei a importância da conjugação destes com os resultados provenientes das restantes áreas.

## **VI. Bioquímica**

No sector de bioquímica acompanhei o trabalho diário, desde a preparação dos equipamentos, até a validação dos resultados. Este sector encontra-se automatizado e analisa um elevado número de parâmetros bioquímicos em amostras de soro e urina. Assim, auxilia na avaliação de distúrbios no nosso organismo, além de permitir a monitorização ou prevenção de doenças.

## **VII. Imunologia**

O sistema imunológico é um sistema de defesa capaz de gerar uma grande variedade de células e moléculas que reconhecem e eliminam especificamente uma variedade de invasores estranhos. No entanto, em algumas circunstâncias, o sistema imunitário falha na proteção, por deficiência de algum dos seus componentes ou torna-se um agressor contra o próprio organismo.<sup>5</sup>

A excelente especificidade das interações antígeno-anticorpo levou ao desenvolvimento de uma variedade de ensaios imunológicos, que podem ser qualitativos ou quantitativos. Estes podem ser utilizados para detetar a presença de anticorpos ou antígenos, desempenhando papéis importantes no diagnóstico de doenças, na monitorização do nível da resposta imunitária humoral e na identificação de moléculas de interesse médico.<sup>5</sup>

No sector de Imunologia/Endocrinologia do laboratório AVELAB as diferentes tarefas são distribuídas por 6 técnicos de análises clínicas. Os vários parâmetros analisados estão incluídos nos seguintes grupos: alergia, anemia, autoimunidade, endocrinologia, função cardiovascular, serologia, oncologia, monitorização terapêutica de medicamentos e pesquisa de drogas de abuso. Neste relatório são abordados os diferentes parâmetros analisados neste sector, exeto os parâmetros toxicológicos, isto é, a monitorização terapêutica de medicamentos e a pesquisa de drogas de abuso.

Como estagiária, para além do trabalho diário, aprendi a importância da manutenção diária dos equipamentos e observei o processamento da gestão de qualidade e da validação dos resultados, onde eu pude aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos durante o Mestrado em Análises Clínicas. Além disso, realizei algumas técnicas manuais e observei lâminas.

### **I. Técnicas Manuais**

No laboratório AVELAB alguns ensaios são realizados através de técnicas manuais, numa sala própria destinada a esse fim.

#### **I.1. Testes VDRL e TPHA**

A bactéria *Treponema pallidum* é o agente patogénico da sífilis, sendo transmitida por via sexual ou congénita. Os testes serológicos podem detetar a presença de dois tipos de anticorpos produzidos por doentes infetados, sendo divididos em treponémicos e não treponémicos. Os anticorpos treponémicos são produzidos contra antígenos específicos da bactéria, enquanto os anticorpos não treponémicos (reaginas) são produzidos contra

componentes das células dos mamíferos. As reaginas, embora quase sempre produzidas por doentes com sífilis, também podem ser produzidas em doenças infecciosas como, por exemplo, a tuberculose ou por condições não infecciosas, como a dependência de drogas, doenças autoimunes e por fatores como idade avançada, gravidez e imunização recente.<sup>6</sup>

O VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) é um teste não treponémico. Neste teste de floculação as reaginas ligam-se ao antígeno do teste (partículas de colesterol revestidas com lecitina e cardiolipina), fazendo com que as partículas floculem. Antes da realização do teste, o reagente deve ser preparado e os soros devem ser inativados por aquecimento durante 30 minutos a 56°C. A reação final tem de ser lida microscopicamente.<sup>6</sup>

Uma vez que a reagina não é um anticorpo específico dirigido contra antígenos da *T. pallidum*, o teste não é específico, podendo ocorrer falsos positivos. O seu título atinge o máximo no terceiro mês da sífilis secundária. Assim, o VDRL pode ser utilizado como teste de rastreio, permitindo detetar mais de 99% dos casos de sífilis secundária.<sup>6,7</sup>

Por sua vez, o TPHA (*Treponema pallidum Hemagglutination Assay*) é um teste treponémico e permite obter resultados positivos alguns dias antes do VDRL. Neste teste ocorre hemaglutinação entre o soro do doente e os glóbulos vermelhos que adquiriram antígenos treponémicos, sendo considerado positivo um título de 1:80.<sup>7</sup>

## **1.2. Ensaios de aglutinação direta**

Os ensaios de aglutinação direta são testes que permitem a deteção dos anticorpos produzidos por um hospedeiro aos determinantes da superfície de um agente bacteriano em resposta à infeção. Os anticorpos ligam-se aos antígenos de superfície das bactérias em suspensão e fazem com que estas se aglutinem em agregados visíveis. Estes ensaios podem ser realizados sobre a superfície de lâminas de vidro ou em tubos. Nestes ensaios estão incluídas as seguintes reações com antígenos febris: Widal, Weil-Felix e Wright.<sup>6</sup>

### **1.2.1. Reação de Widal**

A *Salmonella typhi* é o agente patogénico da febre tifoide e é transmitida por via fecal-oral, através de água e alimentos contaminados.<sup>6</sup>

Os anticorpos aglutinantes podem ser detetados no teste Widal, no qual coloca-se diluições do soro do doente em presença de antígenos O (antígeno somático) e H (antígeno do flagelo) de *Salmonella typhi* e de *Salmonella paratyphi* A, B e C. O anticorpo anti-O é o primeiro a surgir pelo 8º dia e desaparece a meio do segundo mês. O antígeno H aparece entre o 12º e 14º dia e persiste vários anos, por vezes indefinidamente.<sup>7</sup>

O teste de Widal contribui para o diagnóstico da febre tifoide quando as hemoculturas e as coproculturas são negativas. No entanto, este teste pode originar falsos positivos em doentes com infeções provocadas por outras bactérias que geram anticorpos com reação cruzada ou devido à imunização prévia contra a febre tifoide.<sup>6,7</sup>

### **1.2.2. Reação de Weil-Felix**

As rickettsias são bactérias fastidiosas e parasitas intracelulares obrigatórios. Os humanos são infetados após a picada de um vetor artrópode infetado ou por inalação de aerossóis infecciosos.<sup>6</sup>

O diagnóstico das infeções por rickettsias pode ser realizado serologicamente. Muitos doentes infetados produzem anticorpos que podem aglutinar com as bactérias *Proteus vulgaris* OX-19 e OX-2 e *Proteus mirabilis* OX-K. O teste de Weil-Felix deteta os anticorpos de reação cruzada que aglutinam com as estirpes de *P. vulgaris*. Este teste é apenas presuntivo, podendo ocorrer falsos positivos e falsos negativos.<sup>6</sup>

### **1.2.3. Reação de Wright**

A *Brucella spp.* é uma bactéria intracelular facultativa e o agente patogénico da brucelose. A *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. canis* são patogénicas para os seres humanos e cada uma tem um número limitado de animais hospedeiros. Em geral, a *B. melitensis* e a *B. abortus* são as mais virulentas para os seres humanos. A infeção pode ocorrer por três vias principais: ingestão de produtos lácteos não pasteurizados de animais infetados; contacto direto com partes de animais infetados; inalação de partículas de aerossóis.<sup>3,6</sup>

A reação de Wright é um teste serológico de aglutinação que permite detetar os anticorpos do tipo IgM contra a *Brucella abortus* por diluições crescentes do soro. Através deste método podemos obter resultados positivos 10 a 15 dias após início dos sinais clínicos, ocorrendo aglutinação da suspensão das bactérias mortas. O título de 1:80 ou superior pode ser considerado positivo. Após o sexto mês, o resultado surge negativo. No entanto, pode ocorrer reação cruzada com uma variedade de bactérias, tais como a *Francisella tularensis* e *Vibrio cholera*, incluindo a vacinação contra a cólera.<sup>3,6,7</sup>

### **1.3. Reação de Waaler-Rose**

A artrite reumatoide é uma doença autoimune. Muitos indivíduos com artrite reumatoide produzem um grupo de autoanticorpos chamados de fatores reumatoides (FR), geralmente da classe IgM, que são reativos com os determinantes na região Fc da IgG. Esses

autoanticorpos ligam-se a IgG em circulação, formando complexos IgM-IgG que são depositados nas articulações e, conseqüentemente origina a inflamação crónica das articulações. No entanto, o FR não é específico para esta doença e muitas vezes é observado em infeções crónicas e outras condições inflamatórias sistémicas.<sup>3,5</sup>

Na reação de Waaler-Rose, os FR são detetados ao reagirem com o fragmento Fc das imunoglobulinas de animais que recobrem os glóbulos vermelhos, ocorrendo uma reação de aglutinação.<sup>7</sup>

#### **1.4. Imunocromatografia**

Os testes imunocromatográficos são constituídos por um material poroso, em que a amostra pode migrar por ação capilar. A extremidade proximal consiste na zona de adionamento da amostra que contém anticorpos ou antigénios ligados com látex corado ou ouro coloidal, os quais formam um imunocomplexo com o analito a ser detetado. Seguidamente, os complexos formados migram para a zona de deteção, sendo capturados pelos anticorpos ou antigénios imobilizados e formam uma linha colorida positiva.<sup>3</sup>

No laboratório AVELAB, através dos testes imunocromatográficos são determinados alguns parâmetros de forma qualitativa. Em alíquotas de soro são detetados os anticorpos heterófilos da classe da imunoglobulina M (IgM) na mononucleose infecciosa, os anticorpos anti-*Helicobacter pylori* das classes da IgM e imunoglobulina G (IgG) e no teste do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), os anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Através de amostras de urina pode ser realizado o teste da gravidez e a pesquisa de drogas de abuso.

## **2. Equipamentos**

As análises realizadas nos equipamentos automáticos, além de auxiliarem no diagnóstico, permitem a automatização do laboratório. Assim, os equipamentos permitem diminuir as taxas de erro de origem humana e obter resultados laboratoriais com qualidade.<sup>3</sup>

Na tabela 2 encontra-se descrito os equipamentos do sector de Imunologia e Endocrinologia do laboratório AVELAB, os respetivos métodos e os parâmetros avaliados. À maioria dos ensaios são executados no soro. No entanto, as determinações da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) são executadas no plasma em tubos contendo EDTA. As amostras são centrifugadas para separar as fases em suspensão de diferentes densidades.<sup>3,8</sup>

Diariamente são efetuadas as manutenções necessárias para os equipamentos trabalharem ao longo do dia e são processados e analisados os controlos de qualidade internos.

**Tabela 2** – Parâmetros analisados no sector de Imunologia e Endocrinologia e respetivos equipamentos.

Equipamentos	Métodos	Parâmetros
ADVIA Centaur XP (2 equipamentos)	Quimioluminescência direta:	
	• Em <i>sandwich</i>	PTH; TnI; Mioglobina; CpS; Insulina; Anti-HCV IgG; Anti-HBs; HBsAg; HBeAg; Anti-HBc Total; TSH; LH; FSH; PRL; hCG; AFP; PSA total e livre; CEA; CA15-3; CA19-9; CA125.
	• Competitivo	Vitamina D Total; Ácido Valpróico; Carbamazepina; Fenobarbital; Digoxina; Anti-HAV total; Anti-HBe; Vitamina B <sub>12</sub> ; T4 total e livre; T3 total e livre; Estradiol; Progesterona; Testosterona; Folato; Cortisol.
	• Captura de IgM • Quarta geração	Anti-HAV IgM; Anti-HBc IgM. HIV.
IMMULITE 2000	Imunoensaio enzimático por quimioluminescência:	
	• Em <i>sandwich</i>	Anti-Toxo IgG; Anti-rubéola IgM e IgG; Anti-CMV IgM e IgG; Anti-TPO; Anti- TG; ACTH; $\beta$ 2M.
	• Competitivo • Captura de IgM	DHEA-SO <sub>4</sub> . Anti-Toxo IgM.
Phadia 250	Imunoensaio fluoroenzimático:	
	• Tecnologia ImmunoCAP • Tecnologia EliA	IgE específica; IgE total.  Anti-ENA; Anti-Cardiolipina IgG e IgM; Anti-dsDNA; Anti-CCP IgG; Anti-SS- B/La; Anti-SS-A/Ro; Anti- transglutaminase tecidual IgG e IgA.
Zenit SP	Imunofluorescência indireta	Anticorpos antinucleares.



### **3. Marcadores de Anemia**

Nas anemias megaloblásticas ocorre macrocitose e os eritroblastos na medula óssea demonstram um atraso da maturação do núcleo em relação à do citoplasma. Isto deve-se a síntese defeituosa de DNA, em geral causada por deficiência da vitamina B<sub>12</sub> ou do folato e com menor frequência, por anomalias do metabolismo dessas vitaminas e outros defeitos na síntese do DNA. Nas grávidas a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ou folato predispõe a defeitos do tubo neural no feto: anencefalia, espinha bífida ou encefalocele.<sup>9,10</sup>

As dosagens séricas da vitamina B<sub>12</sub> ou de folato auxiliam no diagnóstico da deficiência destes compostos e na avaliação da anemia.<sup>9,10</sup>

#### **3.1. Vitamina B12**

A vitamina B<sub>12</sub> é encontrada em alimentos de origem animal, como fígado, carne, peixe e laticínios. Uma dieta normal contém um grande excesso da vitamina em relação às necessidades diárias. Esta combina-se com o fator intrínseco produzido pelas células parietais gástricas, que por sua vez ajuda na absorção da vitamina B<sub>12</sub> no íleo.<sup>9</sup>

Nos países ocidentais, a deficiência da vitamina em geral decorre de anemia perniciosa (agressão autoimune à mucosa gástrica). Com menor frequência, pode ser provocada por veganismo, gastrectomia e doenças do intestino delgado. A deficiência leva pelo menos dois anos para se desenvolver, isto é, o tempo necessário para que haja depleção dos depósitos. A deficiência severa da vitamina pode causar neuropatia progressiva.<sup>9</sup>

#### **3.2. Folato**

O folato é uma vitamina solúvel em água, que está presente em legumes, frutas, cereais, nozes e carnes. O folato deriva do ácido fólico, uma vez que o organismo humano é incapaz de sintetizar a estrutura do folato e necessita de folato pré-formado. O folato dietético é absorvido no intestino delgado.<sup>9,10</sup>

Em geral, a deficiência de folato decorre de uma dieta pobre em folato, isolada ou em combinação com uma condição em que há aumento da utilização (por exemplo, na gravidez e lactação) ou má absorção de folato.<sup>9,10</sup>

### **4. Marcadores cardíacos**

Os marcadores cardíacos são determinados com o objetivo de avaliar a lesão e a disfunção do miocárdio. No laboratório AVELAB são analisadas a troponina I (TnI) e a

mioglobina. Ambas são proteínas do miocárdio e diferem na sua localização dentro dos miócitos, na cinética de libertação após a lesão e na *clearance* da circulação.<sup>8</sup>

#### **4.1. Troponina I**

A troponina é um complexo de proteínas formada por três subunidades que regulam a interação entre a miosina e actina, e assim, regulam a contração cardíaca. As três subunidades são a troponina C, troponina I (TnI) e troponina T. A troponina localiza-se principalmente nas miofibrilas e uma pequena fração no citoplasma.<sup>3,8</sup>

A TnI cardíaca humana possui um resíduo de 31 aminoácidos adicional na extremidade amino-terminal em comparação com a TnI do músculo-esquelético, conferindo especificidade cardíaca. Apenas uma isoforma de TnI cardíaca foi identificada e não é expressa em condições normais, de regeneração ou de doenças no músculo-esquelético. Esta é utilizada como marcador na lesão do miocárdio e no diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio. Após o enfarte agudo do miocárdio, a TnI atinge um pico em cerca de 12 a 16 horas e permanece elevada por 5 a 9 dias.<sup>3,8</sup>

#### **4.2. Mioglobina**

A mioglobina é uma proteína de transporte do oxigénio no músculo cardíaco e esquelético, com localização citoplasmática. A quantificação da mioglobina sérica é realizada, porque esta aumenta rapidamente após o enfarte agudo do miocárdio. Normalmente, o pico ocorre em cerca de 6 horas e retorna aos valores basais após 24 horas. No entanto, não há diferenças entre as proteínas de mioglobina encontradas no coração ou no músculo-esquelético. Assim, o aumento do nível de mioglobina no soro pode ser devido tanto por um trauma no músculo-esquelético quer no músculo cardíaco. Além disso, a mioglobina é eliminada pelos rins, conseqüentemente alterações na função renal também podem originar valores aumentados.<sup>3,8</sup>

### **5. Estudo da função endócrina**

A hormona é uma substância química produzida no corpo por um órgão, células de um órgão, ou em células dispersas e que tem um efeito regulador específico sobre a atividade de um ou mais órgãos. As hormonas que são produzidas num local do corpo e exercem a sua ação em locais distantes designam-se de hormonas endócrinas. O sistema endócrino é um sistema onde o hipotálamo, a hipófise e as glândulas endócrinas comunicam através de um *feedback* de inibição e estimulação.<sup>3,8</sup>

## 5.1. Diabetes mellitus

A diabetes *mellitus* é um grupo de distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono, originando hiperglicemia. Alguns indivíduos podem experimentar ameaças de episódios agudos hiperglicêmicos e conforme a doença progride, possuem um maior risco para o desenvolvimento de complicações específicas, incluindo retinopatia, insuficiência renal, neuropatia e aterosclerose. As formas mais comuns de diabetes *mellitus* são a diabetes insulina-dependente (tipo 1) e a diabetes não insulina-dependente (tipo 2). Nas grávidas pode ocorrer a diabetes *mellitus* gestacional.<sup>3,8</sup>

### 5.1.1. Insulina e peptídeo C

Nas células  $\beta$  do pâncreas, a clivagem proteolítica da pró-insulina origina insulina e peptídeo C (CpS). A insulina é uma hormona anabólica que estimula a captação da glucose no tecido adiposo e nos músculos, promove a conversão da glucose em glicogénio ou ácidos gordos para armazenamento, inibe a produção de glucose pelo fígado e estimula a síntese de proteínas. A quantificação dos níveis da insulina e do CpS têm como aplicação clínica a avaliação dos doentes com hipoglicémia de jejum.<sup>8</sup>

Embora a insulina e o CpS sejam segregados para a circulação em quantidades equimolares, em jejum as concentrações do CpS são cinco a dez vezes superiores aos de insulina, devido à meia-vida mais longa do CpS. A *clearance* da insulina ocorre no fígado, enquanto o CpS é removido da circulação pelos rins. Consequentemente, a quantificação do CpS oferece algumas vantagens em relação a insulina, uma vez que os níveis do CpS são melhores indicadores da função das células  $\beta$ . Além disso, os ensaios do CpS não quantificam a insulina exógena e não apresentam reação cruzada com os anticorpos da insulina.<sup>3,8</sup>

Os estados de doença ocorrem quando as concentrações de insulina são inadequadas para determinados níveis de glucose no sangue, pelo que a diabetes *mellitus* tipo 1 resulta da deficiência de insulina. Um nível elevado de insulina na presença de um nível baixo de glucose sugere inadequada secreção ou a administração de insulina. Por outro lado, níveis elevados de insulina podem ser observados em doentes com resistência à insulina e que necessitam segregar mais insulina para manter os níveis de glucose no sangue normais.<sup>3,8</sup>

Nos tumores secretores de insulina, especialmente insulinomas, a secreção de insulina em excesso provoca hipoglicemia. Os soros dos doentes com insulinomas têm níveis altos da insulina e de CpS, enquanto na hipoglicemia resultante da insulina injetada é caracterizada por níveis elevados de insulina e níveis baixos de CpS. Além destes fatores, os níveis do CpS podem aumentar na insuficiência renal.<sup>3</sup>

## 5.2. Endocrinologia reprodutiva

A endocrinologia reprodutiva engloba as hormonas endócrinas que estão sob o controlo do eixo hipotalâmico-hipofisário e as produzidas pelas glândulas suprarrenais e da placenta. Estas hormonas são fundamentais para uma função reprodutiva adequada e incluem a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), a hormona luteinizante (LH), hormona folículo-estimulante (FSH) e os esteroides sexuais.<sup>3,8</sup>

No homem e na mulher a GnRH libertada no hipotálamo estimula a síntese e a secreção da LH e FSH na adenohipófise. No entanto, ao contrário do homem, na mulher o processo de regulação é cíclico e é referido como o ciclo menstrual (Figura 1).<sup>3,8</sup>

Podem ocorrer algumas anormalidades no sistema reprodutor masculino e feminino, pelo que os vários estados de doença podem ser categorizados de acordo com a deficiência ou excesso de hormonas e com a disfunção primária (gónadas) ou secundária (hipófise). Na disfunção primária, os níveis das hormonas produzidas pelas gonadas estão inversamente relacionados com os níveis das hormonas da hipófise, enquanto nas disfunções secundárias estão diretamente relacionados. Estas mudanças ocorrem porque as hormonas produzidas pelas gonadas exercem um *feedback* negativo sobre o eixo hipotálamo-hipófise. As dosagens dos níveis hormonais auxiliam no diagnóstico de uma disfunção específica.<sup>3</sup>

### 5.2.1. Hormona Folículo-Estimulante e Hormona Luteinizante

Na mulher, a FSH estimula o crescimento e a maturação dos folículos do ovário, a secreção de estrogénio e promove as alterações do endométrio características da primeira fase (fase proliferativa). A LH atua com a FSH para promover a ovulação e a secreção de androgénios e progesterona. A LH também inicia e mantém a segunda fase (secretora) do ciclo menstrual, além de estimular a formação do corpo lúteo.<sup>8</sup>

Nos homens, a LH e FSH são secretadas de forma pulsátil, com maiores concentrações nas primeiras horas da manhã e concentrações mais baixas no final da noite. A FSH atua em células de Sertoli para estimular a gametogénese e a síntese e libertação de inibina. A LH estimula o desenvolvimento e atividade funcional das células de Leydig nos testículos, ocorrendo produção da testosterona. Os esteroides sexuais e a inibina originam o *feedback* negativo da secreção de LH e FSH, respetivamente.<sup>8</sup>

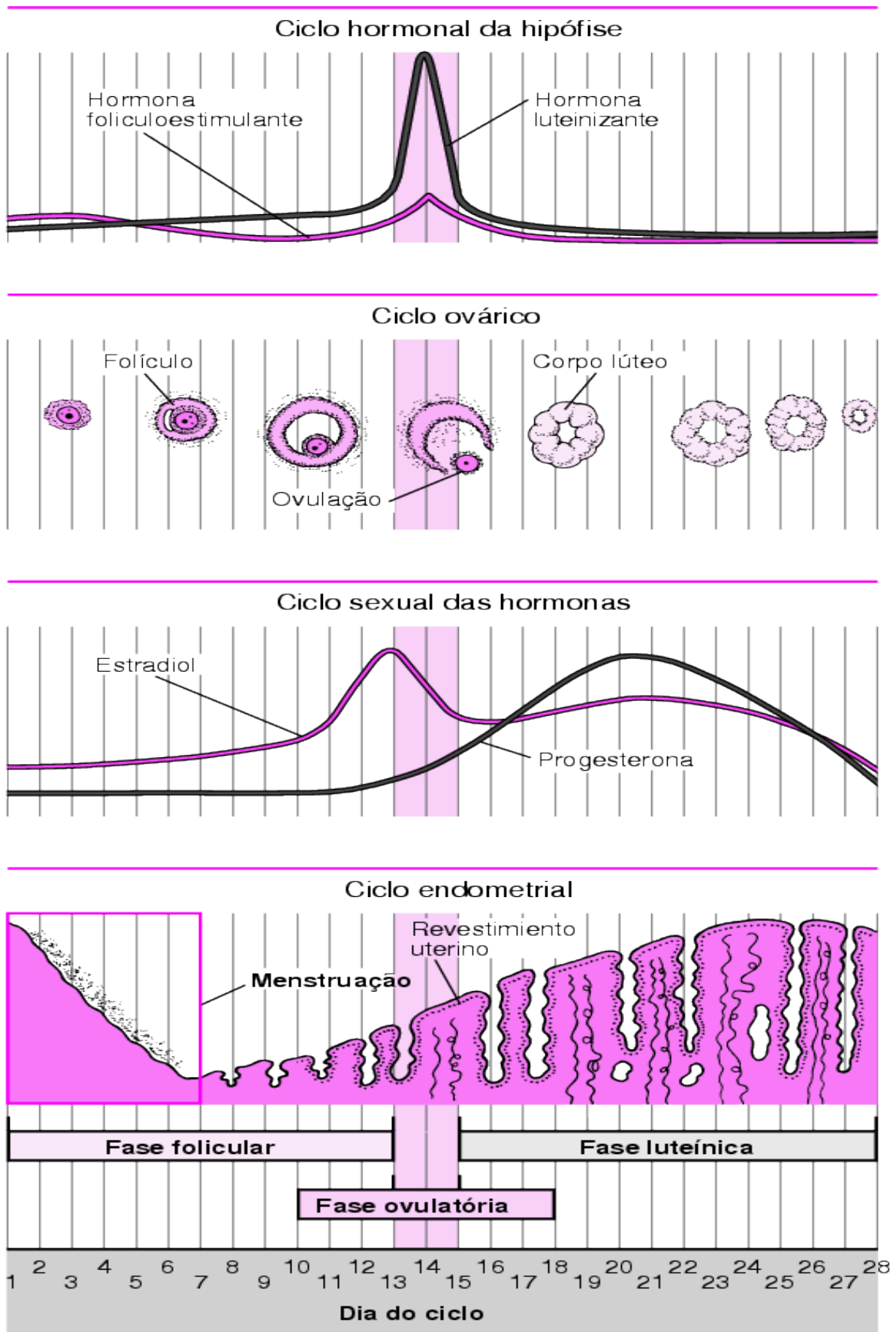


Figura I – Ciclo menstrual da mulher. (Acedido em <http://www.manualmerck.net>).

### 5.2.2. Estradiol

O estrogénio mais potente secretado pelo ovário é o  $17\beta$ -estradiol. Uma vez que este é derivado quase exclusivamente dos ovários, a sua quantificação permite avaliar a função ovariana. O estradiol é essencial para o desenvolvimento do endométrio proliferativo e atua sinergicamente com a progesterona para o desenvolvimento das alterações no endométrio.<sup>8</sup>

A produção de estradiol pelo ovário diminui próximo do fim de um ciclo, mas depois começa a aumentar sob a influência da FSH, atingindo o pico entre os 250 e 500 pg/mL no meio do ciclo. As concentrações de estradiol caem abruptamente após a ovulação, mas sobem novamente com o corpo lúteo, como pode ser observado na figura 1. A progesterona produzida pelo corpo lúteo, combinada com o estrogénio, exerce um *feedback* negativo sobre o hipotálamo e lóbulo anterior da hipófise, suprimindo a secreção de FSH e LH durante a fase luteínica.<sup>8</sup>

### 5.2.3. Progesterona

Os níveis da progesterona aumentam após o pico da LH e ovulação, como pode ser observado na figura 1. A LH melhora a diferenciação das células da teca e a produção de progesterona que, por sua vez, aumenta até atingir o máximo cerca de 8 dias após o pico da LH. A progesterona promove o crescimento e preparação do endométrio para a implantação do óvulo fertilizado, além de manter a gravidez. Nas mulheres não grávidas, a progesterona é secretada pelo corpo lúteo, enquanto nas grávidas é sintetizada principalmente pela placenta. Uma menor quantidade é produzida pelo córtex adrenal em ambos os sexos e pelos testículos nos homens.<sup>8</sup>

### 5.2.4. Testosterona

A testosterona é secretada pelas células de Leydig dos testículos, e os seus níveis aumentam durante a puberdade. A testosterona influencia o desenvolvimento de algumas características sexuais secundárias, como o aprofundamento da voz, aumento da massa muscular e o libido. Por sua vez, as mulheres produzem cerca de 5% a 10% de testosterona em comparação com os homens.<sup>8</sup>

A concentração total da testosterona no sangue inclui coletivamente uma forma livre, uma forma fracamente ligada com albumina e outra forma fortemente vinculada com a globulina de ligação das hormonas sexuais (SHBG). A testosterona biodisponível inclui a forma livre e ligada à albumina, pois encontram-se disponíveis para as células alvo. Contudo, a testosterona ligada a SHBG não é biologicamente ativa.<sup>8</sup>

### 5.2.5. Dehidroepiandrosterona-Sulfato

A dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-SO<sub>4</sub>) é produzida principalmente pelas glândulas suprarrenais, embora em alguns homens pode ser derivada dos testículos. A quantificação de DHEA-SO<sub>4</sub> é importante para analisar a produção dos androgénios adrenais, por exemplo, na avaliação da hiperplasia, nos tumores adrenais, na puberdade atrasada ou no hirsutismo.<sup>8</sup>

### 5.2.6. Gonadotrofina Coriónica Humana

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) é uma hormona produzida na placenta. Esta estimula o ovário na produção de progesterona, que, por sua vez, impede a menstruação protegendo assim a gravidez. A hCG é um heterodímero composto por duas subunidades de glicoproteínas não idênticas e não ligadas covalentemente:  $\alpha$  e  $\beta$ . A hCG é encontrada no soro materno em muitas formas, incluindo na forma intacta e nas suas subunidades livres.<sup>3,8</sup>

No laboratório AVELAB o teste de gravidez pode ser realizado utilizando soro e/ou urina. No soro é feita uma determinação quantitativa dos níveis totais da hCG, através da quantificação da hCG intacta e da  $\beta$ -hCG livre.<sup>3,8</sup>

Nas primeiras oito semanas de gestação, a concentração da hCG aumenta rapidamente no soro, sendo detetável 8 a 11 dias após a conceção. Ocorre um pico da concentração entre a 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana, posteriormente a concentração começa a declinar no soro e na urina. Até ao final do segundo trimestre, geralmente ocorre uma redução de 90% da concentração do pico. Para as mulheres entre os 18 a 40 anos, as concentrações séricas iguais ou superiores a 5 mUI/mL são consistentes com uma gravidez.<sup>3,8</sup>

Este doseamento, além da deteção da gravidez e das suas alterações (por exemplo, as gravidezes ectópicas e molares), permite a despistagem da trissomia 21 e 18 e avaliação da progressão dos tumores produtores de hCG, tais como os tumores trofoblásticos.<sup>3,8</sup>

Por sua vez, nas amostras de urina, através de um teste imunocromatográfico podemos obter um resultado qualitativo. A urina deve ser a primeira da manhã, porque a hCG encontra-se mais concentrada. O teste na urina permite diagnosticar uma gravidez, quando esta progrediu após a primeira semana da ausência de menstruação.<sup>3,8</sup>

### 5.2.7. Prolactina

A prolactina (PRL) é um polipéptido secretado pela adenohipófise e é responsável pela iniciação e manutenção da lactação, pelo que se encontra aumentada na gravidez. Numa situação normal, a sua secreção é mantida em níveis baixos por ação inibidora da

dopamina produzida pelo hipotálamo. A PRL é secretada num ritmo circadiano, atingindo níveis mais elevados durante o sono. A amplitude e a frequência da secreção pulsátil não só variam ao longo do dia, mas também são influenciadas por uma variedade de estímulos fisiológicos como, por exemplo, o stress ou o exercício.<sup>3,8</sup>

A hiperprolactinémia conduz a inibição da secreção da GnRH tanto no homem como na mulher. Nas mulheres que têm alterações subtis de fertilidade, as concentrações de PRL podem estar elevadas, como por exemplo, anovulação com ou sem menstruação irregular, amenorreia e galactorreia ou apenas galactorreia. O excesso de PRL em homens frequentemente manifesta-se com oligospermia e/ou impotência. Também pode ocorrer concentrações elevadas em doentes com síndrome dos ovários poliquísticos ou com adenomas hipofisários. Alguns medicamentos também podem aumentar os níveis de PRL numa pessoa saudável, assemelhando-se bioquimicamente a um prolactinoma.<sup>3,8</sup>

Normalmente, uma concentração de PRL superior a 200 µg/L é suficiente para suspeitar de um tumor hipofisário secretor de PRL. No entanto, os "pseudo-prolactinomas" são grandes tumores não secretores e que pressionam a haste hipofisária, interrompendo o fluxo normal da dopamina e, conseqüentemente, originam elevações de PRL entre os 50 e 200 µg/L.<sup>3,8</sup>

### **5.3. Função do Córtex Adrenal**

Nas cápsulas suprarrenais, as células do córtex adrenal sintetizam hormonas esteroides que possuem uma ampla variedade de funções fisiológicas. Estas incluem os glucocorticoides, mineralocorticoides e androgénios adrenais. As desordens do córtex adrenal podem resultar da sua hipofunção ou hiperfunção.<sup>8</sup>

#### **5.3.1. Hormona Adrenocorticotrófica**

A hormona adrenocorticotrófica (ACTH) é uma hormona secretada pela adenohipófise, por estimulação da hormona libertadora da corticotrofina (CRH). Esta atua principalmente no córtex adrenal, estimulando o seu crescimento e a síntese e secreção de corticosteroides. Esta hormona possui um ritmo circadiano e as concentrações no plasma são normalmente muito baixas. A sua produção aumenta durante períodos de stress.<sup>3,8</sup>

Para prevenir a degradação de ACTH, a amostra deve ser recolhida num tubo contendo EDTA e deve ser processada o mais rápido possível. A quantificação da ACTH auxilia na distinção entre a insuficiência primária (adrenal) e a secundária (hipófise) ou terciária (hipotálamo).<sup>3</sup>



Os níveis da ACTH também podem aumentar na presença de carcinomas produtoras do seu precursor, a pró-ACTH. Uma concentração superior a 200 ng/L é sugestiva de origem ectópica e cerca de metade da produção ectópica de ACTH resulta de carcinomas pulmonares de pequenas células. Outras condições que também elevam as concentrações da ACTH incluem o cancro gástrico, do pâncreas, da mama, do cólon e condições benignas, tais como, a doença pulmonar obstrutiva crónica, depressão mental, obesidade, hipertensão arterial e diabetes *mellitus*.<sup>8</sup>

### **5.3.2. Cortisol**

A produção de cortisol é estimulada pela ACTH e, conseqüentemente, o cortisol origina o *feedback* negativo no eixo CRH-ACTH. O ritmo circadiano da secreção de ACTH produz concentrações de cortisol mais elevadas no período da manhã, entre às 4 horas e o meio-dia, e menores concentrações durante à noite. A concentração do cortisol pela manhã é afetada por fatores familiares e genéticos, mas nos adultos não há dependência significativa com a idade ou sexo. O aumento da secreção de cortisol pode ocorrer devido ao *stress*, após a terapia com glucocorticoides, na gravidez, em estados de depressão, na hipoglicemia e no hipertireoidismo.<sup>3,8</sup>

## **5.4. Função da tiróide**

A tiróide é uma glândula produtora de hormonas, principalmente da tri-iodotironina (T3) e da tiroxina (T4). Um eixo intacto entre o hipotalâmico, hipófise e tiróide e uma fonte de iodeto são necessários para a síntese normal destas hormonas. O hipotálamo segrega a hormona libertadora da tireotrofina que, por sua vez, estimula a adenohipófise na secreção da hormona tireotrófica (TSH). Esta última hormona estimula a síntese e secreção das hormonas da tiróide e, conseqüentemente, estas hormonas exercem *feedback* negativo, tanto no hipotálamo como na hipófise.<sup>3,8</sup>

### **5.4.1. Hormona Tireotrófica**

A secreção da TSH ocorre num ritmo circadiano, com maiores concentrações à noite, entre as 2:00 e 4:00 horas, e concentrações mais baixas entre as 17:00 e 18:00 horas. Ao longo do dia podem ocorrer oscilações de baixa amplitude, mas não há diferenças significativas dos níveis de TSH devido ao sexo ou raça.<sup>8</sup>

A quantificação da TSH permite avaliar a função da tiróide e auxilia na identificação dos casos de hipertireoidismo e hipotireoidismo, exceto quando há dano no hipotálamo ou

na hipófise, resistência à hormona da tireoide ou interferência do funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide devido à medicação.<sup>3</sup>

#### **5.4.2. Tiroxina e Tri-iodotironina**

Na circulação, a T3 e T4 encontram-se ligados de forma reversível às proteínas transportadoras que ligam cerca de 99,97% da T4 e 99,7% da T3. Assim, apenas uma pequena fração de cada uma destas hormonas se encontra na forma livre para exercer a atividade biológica. Uma vez que existe uma grande variação na concentração das proteínas de ligação da T4, consequentemente, também existe uma grande variação nas concentrações da T4 total nos indivíduos com função normal da tiróide. As concentrações da T3 total também podem variar, embora em menor grau do que as concentrações da T4.<sup>8</sup>

As dosagens da T4 são frequentemente usadas em conjunto com a TSH e podem ser importantes na interpretação dos resultados da TSH. Por exemplo, um valor baixo da T4 e um aumento da TSH é indicativo de hipotireoidismo primário, ao passo que níveis de T4 e T3 elevados e níveis reduzidos de TSH são característicos do hipertireoidismo primário. No entanto, no hipertireoidismo os doentes podem possuir níveis elevados de T4 no soro, mas apresentarem níveis de T3 dentro dos valores de referência ou baixos e isto designa-se de tireotoxicose da T4.<sup>3</sup>

Por sua vez, a dosagem de T3 total auxilia no diagnóstico e acompanhamento de doentes com hipertireoidismo com supressão da TSH e concentrações normais da T4 livre (tireotoxicose da T3). Contudo, as quantificações da T3 têm apenas um papel limitado na síndrome do doente eutiróideo e no hipotireoidismo.<sup>3,8</sup>

A T4 livre e a T3 livre são as frações biologicamente ativas no sangue. As estimativas geralmente permitem obter resultados fiáveis em pessoas saudáveis, doentes com hipertireoidismo e hipotireoidismo e doentes com anormalidades leves nas proteínas de ligação.<sup>3,8</sup>

#### **5.5. Hormonas do metabolismo ósseo**

O osso possui funções mecânicas, protetoras e metabólicas. O seu crescimento e manutenção da sua integridade são influenciados pelo metabolismo do cálcio, fosfato, magnésio e por muitas hormonas. A paratormona (PTH) e a 1,25-di-hidroxitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] são as principais hormonas que regulam o metabolismo ósseo e mineral.<sup>8</sup>

### 5.5.1. Vitamina D Total

A vitamina D é produzida endogenamente na pele por exposição à luz solar e também é absorvida a partir de alimentos. No organismo, a vitamina D é metabolizada na sua forma circulante, 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], sendo depois convertida na sua forma biologicamente ativa, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Esta hormona regula o metabolismo do cálcio e do fosfato.<sup>3,8</sup>

A deficiência de vitamina D conduz à formação deficiente dos ossos, originando o raquitismo nas crianças e osteomalácia nos adultos. Os fatores de risco para o desenvolvimento da deficiência nutricional da vitamina D, incluem vegetarianos que se abstêm de ovos e leite, pessoas de pele escura, envelhecimento da pele e idade. As concentrações séricas de 25(OH)D são o melhor indicador do estado nutricional de vitamina D. Isto deve-se, porque a 25(OH)D é a principal forma circulante da vitamina D e varia menos de dia para dia com exposição à luz solar e com a ingestão de alimentos, devido à sua meia-vida longa.<sup>3,8</sup>

A quantificação da concentração da 25(OH)D é útil na avaliação da hipocalcemia, das doenças dos ossos e outros distúrbios do metabolismo mineral. As concentrações da 25(OH)D podem diminuir por: redução da disponibilidade da vitamina D; conversão inadequada da vitamina D em 25(OH)D; aceleração do metabolismo da 25(OH)D; e perda urinária juntamente com a sua proteína de transporte. No entanto, a quantificação da 25(OH)D possui um papel limitado na hipercalcemia, sendo mais usado nesta condição para confirmação de intoxicação após ingestão de elevadas concentrações de vitamina D ou 25(OH)D.<sup>8</sup>

### 5.5.2. Paratormona

A PTH é sintetizada, armazenada e secretada pelas glândulas paratiróides. A PTH influencia a homeostase do cálcio e do fosfato, diretamente no osso e no rim e indiretamente no intestino através da 1,25(OH)<sub>2</sub>D. A quantificação da PTH é útil no diagnóstico diferencial da hipercalcemia e da hipocalcemia, na avaliação da função da paratiróide na insuficiência renal e em desordens ósseas e minerais.<sup>8</sup>

No diagnóstico diferencial da hipocalcemia, a PTH aumenta no hiperparatiroidismo secundário, antes de cálcio total ou livre torna-se anormalmente baixo, sendo a insuficiência renal crónica uma causa comum. Além disso, o doseamento permite distinguir o hipoparatiroidismo (PTH baixa) do pseudo-hipoparatiroidismo (PTH elevada) resultante da resistência periférica à PTH.<sup>7,8</sup>

Perante uma hipercalcemia, a PTH aumenta na maioria dos doentes com hiperparatireoidismo primário, enquanto nos doentes com hipercalcemia de outra origem a PTH diminui.<sup>7,8</sup>

## **6. Marcadores tumorais**

Um marcador tumoral é uma substância produzida por um tumor ou pelo doente em resposta ao tumor, permitindo diferenciar o tumor do tecido normal ou determinar a presença de um tumor através de análises ao sangue ou secreções. Os marcadores podem ser usados clinicamente para o diagnóstico, prognóstico e avaliação dos efeitos da terapia. Os marcadores tumorais vulgarmente utilizados no diagnóstico são: os antigénios oncofetais, nomeadamente a  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) e o antigénio carcinoembrionário (CEA); as proteínas que ocorrem em células epiteliais e que se tornam elevadas no tecido e no soro em carcinomas de células escamosas e adenoescamosas, tais como as proteínas CA 19-9, CA 125, CA 15-3; hormonas polipeptídicas, como a cadeia  $\beta$  da hCG, e enzimas específicas, como por exemplo, o antigénio específico da próstata (PSA).<sup>3,8</sup>

### **6.1. Antigénio específico da próstata total**

O PSA é sintetizado exclusivamente nas células epiteliais da glândula da próstata e a sua expressão é regulada pelo recetor de androgénio. A sensibilidade do cancro e especificidade tecidular do PSA torna este marcador o mais útil para o rastreio, avaliação do tratamento e da recorrência do cancro de próstata.<sup>3,8</sup>

No entanto, a falta de especificidade distintiva entre o cancro de próstata e lesões não malignas da próstata é a principal desvantagem do PSA. Estados benignos, tais como, hiperplasia benigna da próstata (HBP) e prostatite aguda, também podem ser correlacionados com níveis elevados de PSA no soro. Por outro lado, sendo o intervalo normal de referência entre 0 a 4 ng/mL, o *cut-off* de 4 ng/mL pode não ser suficiente para distinguir doentes com e sem cancro da próstata, incluindo os cancros mais agressivos.<sup>3</sup>

### **6.2. Antigénio específico da próstata livre**

O PSA é capaz de complexar com vários inibidores de proteases endógenos, incluindo  $\alpha$ 1-antiquimotripsina,  $\alpha$ 2-macroglobulina (ao qual liga-se covalentemente) e inibidor da  $\alpha$ -protease. As formas não complexadas, conhecidas como PSA livre (fPSA), não são reativas com os inibidores de proteases. No cancro da próstata, geralmente há um aumento da concentração sérica do PSA complexado e uma diminuição no fPSA. Por outro lado, a quantidade relativa de fPSA é maior na HBP do que no cancro da próstata.<sup>3</sup>

A quantificação do fPSA e o cálculo da percentagem de fPSA ( $\% \text{ fPSA} = [\text{fPSA} / \text{PSA total}] \times 100$ ), que tem uma relação inversa com o risco de cancro da próstata, têm sido usados para ajudar a diferenciar a HBP do cancro de próstata. Além disso, o fPSA melhora a especificidade da deteção do cancro da próstata em homens com PSA entre 4 e 10 ng/mL. Também pode ser utilizado na previsão do cancro da próstata em doentes com valores de PSA total abaixo de 4 ng/mL.<sup>3</sup>

### **6.3. $\alpha$ -Fetoproteína**

A  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) é uma proteína do soro fetal e em adultos saudáveis a concentração no soro é normalmente inferior a 10  $\mu\text{g/L}$ . Concentrações elevadas no soro permitem detetar os carcinomas hepatocelulares. Dado que a concentração sérica da AFP se correlaciona com o tamanho do tumor, a deteção do carcinoma hepatocelular é mais útil nas fases iniciais, quando o tumor é pequeno o suficiente para ser operado. A AFP também é útil no prognóstico e na avaliação da terapêutica.<sup>3,8</sup>

Contudo, os níveis da AFP podem estar elevados nas grávidas, em doentes com tumores de células germinativas derivadas do saco vitelino e em muitas doenças hepáticas benignas. A combinação dos testes da AFP e hCG são úteis na redução de erros na determinação do estágio clínico em doentes com tumores testiculares e ajuda no diagnóstico diferencial de vários tumores de células germinativas.<sup>3,8</sup>

### **6.4. Antígeno carcinoembrionário**

O CEA encontra-se elevado numa variedade de cancros, tais como do pulmão, colo-retal, gástrico, pancreático, da mama, do ovário e do útero. Por causa das elevações associadas com doenças benignas e do número de tumores que não produzem o CEA, este marcador não deve ser utilizado para o rastreio.<sup>3,8</sup>

O CEA pode ser usado como um marcador para avaliação do cancro colo-retal e como um complemento para determinar o estágio clínico. Níveis persistentemente elevados, 5 a 10 vezes superiores aos de referência, sugerem a presença de cancro do cólon, mas também podem ser associados a outros cancros. O CEA é útil para acompanhar os doentes durante o tratamento e na evolução clínica da doença. Além disso, este marcador também pode ser utilizado na avaliação do cancro da mama, do pulmão, gástrico e pancreático.<sup>3,8</sup>

### **6.5. CA 15-3**

O CA15-3 é um antígeno frequentemente libertado na circulação em quantidades elevadas, por células glandulares malignas, tais como as que ocorrem no cancro da mama,

podendo ser usado como marcador tumoral. Contudo, o CA 15-3 não é útil no rastreio deste cancro, porque pode encontrar-se elevado num certo número de condições benignas, incluindo tumores benignos do ovário, doenças benignas da mama, hepatite crónica, cirrose hepática, sarcoidose, tuberculose, lúpus eritematoso sistémico e hipotireoidismo. Também é encontrado em outras doenças malignas, incluindo o cancro do pâncreas, do pulmão, do ovário, colo-retal e do fígado.<sup>3,8</sup>

O CA 15-3 é o marcador mais sensível e específico para o acompanhamento da evolução clínica e na avaliação da terapia dos doentes com cancro da mama metastático. O CA 15-3 não deve ser utilizado para diagnosticar o cancro da mama primário, porque a incidência de elevação é bastante baixa. Os seus níveis aumentam com os estádios mais elevados do cancro mama.<sup>3,8</sup>

#### **6.6. CA 125**

O CA 125 é utilizado como marcador para o cancro do ovário. No entanto, não é útil para o rastreio deste tipo de cancro, pois a elevação dos níveis do CA 125 ocorre numa série de cancros não ovarianos, incluindo no endométrio, pâncreas, pulmão, na mama, colo-retal e outros tumores gastrointestinais. Também se encontra elevado em mulheres na fase folicular do ciclo menstrual e em condições benignas, tais como cirrose, hepatite, endometriose, pericardite e início da gravidez. O CA 125 também pode ser utilizado clinicamente para seguir os tumores uterinos e os tumores benignos, incluindo endometriose.<sup>3,8</sup>

No cancro do ovário, a concentração de CA 125 correlaciona-se com o tamanho e estágio do tumor. Este marcador também é também útil na diferenciação da doença benigna da maligna em doentes com massas ovarianas palpáveis, na determinação do prognóstico e na deteção de doença residual em doentes oncológicos após o tratamento inicial.<sup>3,8</sup>

#### **6.7. CA 19-9**

O CA 19-9 pode estar elevado em doentes com cancro colo-retal, hepatocelular, gástrico, hepatobiliar, da mama e do pâncreas. Habitualmente, as concentrações do marcador encontram-se muito elevadas nos carcinomas gástricos e pancreáticos, sendo utilizadas para avaliar o sucesso da terapia e a deteção da reincidência do cancro.<sup>3,8</sup>

A quantificação do CA 19-9 no soro auxilia no acompanhamento de doentes com diagnóstico de cancro do pâncreas e no estabelecimento do prognóstico no momento do diagnóstico inicial. Quando em concentrações elevadas este marcador permite distinguir

entre o cancro do pâncreas e a doença pancreática benigna e as concentrações correlacionam-se com o estágio do cancro.<sup>8</sup>

### 6.8. $\beta$ -2-microglobulina

A  $\beta$ -2-microglobulina ( $\beta$ 2M) é um componente do complexo major de histocompatibilidade de classe I (MHC I) expresso na superfície da maioria das células nucleadas. A  $\beta$ 2M é libertada no fluido extracelular, encontrando-se elevada em tumores sólidos e em doenças linfoproliferativas, incluindo leucemia linfoide crónica das células B, linfoma de não-Hodgkin e mieloma múltiplo. A concentração sérica da  $\beta$ 2M correlaciona-se com a atividade dos linfócitos, sendo um bom marcador para as malignidades linfoides da linha das células B e pode ser usado como um indicador da resposta do doente ao tratamento.<sup>3,5</sup>

## 7. Serologia

Na imunidade humoral ocorre a produção de anticorpos contra um agente infeccioso específico. Assim, o soro do doente pode ser testado quanto à presença dos anticorpos.<sup>6</sup>

A resposta imunitária amadurece com exposição continuada aos antígenos presentes e os anticorpos produzidos tornam-se mais específicos e apresentam uma avidéz mais forte. Os métodos serológicos de diagnóstico são normalmente utilizados para medir duas classes de anticorpos: a IgM e a IgG. A IgM é produzida como uma primeira resposta, indicando exposição ou infeção recente, embora os níveis permaneçam elevados apenas transitoriamente. Por outro lado, o anticorpo IgG pode persistir por muito tempo após a infeção e é mais específico para o antígeno.<sup>6</sup>

Para fins de diagnóstico serológico, uma diferença importante entre estas duas classes de anticorpos é que a IgM não pode atravessar a placenta de mulheres grávidas. As infeções com agentes patogénicos, tais como, o *Toxoplasma gondii*, citomegalovírus, vírus da rubéola e *Treponema pallidum*, podem ser silenciosas ou causar apenas pequenos sintomas na mãe. No entanto, o sistema imunitário imaturo do feto não gera uma resposta eficaz, pelo que a necrose do tecido fetal pode ser grave ou mesmo fatal.<sup>3,6</sup>

Outra diferença surge durante um segundo contacto com o mesmo agente patogénico, em que geralmente induz uma resposta com aumento dos níveis da IgG. Devido a capacidade de memória dos linfócitos B, estes podem responder mais rapidamente e com maior número de anticorpos do que na interação inicial.<sup>6</sup>

Nas técnicas manuais já foram abordados alguns ensaios pertencentes à serologia, isto é, os testes de VDRL e TPHA e as reações de Widal, Weil-Felix e Wright. Os restantes parâmetros utilizados são seguidamente desenvolvidos.

### **7.1. Vírus Epstein-Barr**

A mononucleose infecciosa é uma doença linfoproliferativa sistémica comum, geralmente resultante de uma infeção primária pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e é transmitido pela saliva. Na infância, a infeção primária é geralmente assintomática, mas se ocorre na adolescência ou em jovens adultos, origina muitas vezes mononucleose infecciosa. O EBV infeta primeiro a faringe, pelo que a dor de garganta, febre e amigdalite tipicamente marcam o início da doença.<sup>3</sup>

Na mononucleose infecciosa são produzidos os anticorpos heterófilos de Paul-Bunnell pelos linfócitos B induzidos pelo EBV. Estes anticorpos da classe IgM tem afinidade para eritrócitos de ovelhas, cavalos e bovinos, e não são dirigidos contra quaisquer antigénios do EBV. Os anticorpos surgem durante a primeira semana da mononucleose infecciosa, diminuem durante a convalescença e geralmente são indetetáveis após 3 a 6 meses.<sup>3</sup>

### **7.2. Citomegalovírus**

O citomegalovírus (CMV) origina a infeção intrauterina mais comum e a maioria das crianças são assintomáticas no momento do nascimento. No entanto, as sintomáticas podem apresentar icterícia, hepato-esplenomegalia e pancitopenia, pelo que cerca de 10% desses bebés acabam por morrer e os restantes sofrem sequelas neurológicas permanentes.<sup>3</sup>

A infeção primária na mãe possui o risco de transmissão vertical e de infeção congénita. Na reativação da infeção as IgG anti-CMV maternas atravessam a placenta, conferindo um pouco de proteção e geralmente as crianças são assintomáticas no momento do nascimento. Contudo, em cerca de 5% a 15% dessas crianças ocorre perda auditiva neurosensorial ou dificuldades no desenvolvimento neurológico. A reinfeção com uma nova estirpe de CMV tem um maior risco de causar infeção congénita sintomática.<sup>3</sup>

Em mulheres adultas a IgM anti-CMV pode persistir por mais de 3 meses, obscurecendo o valor interpretativo do resultado durante a gravidez. O teste de avidéz da IgG anti-CMV pode ser útil para destingir entre infeção recente e antiga, pelo que a identificação de IgM e de IgG com avidéz fraca numa mulher grávida correlaciona-se com a infeção primária com um alto risco de transmissão intrauterina.<sup>3</sup>



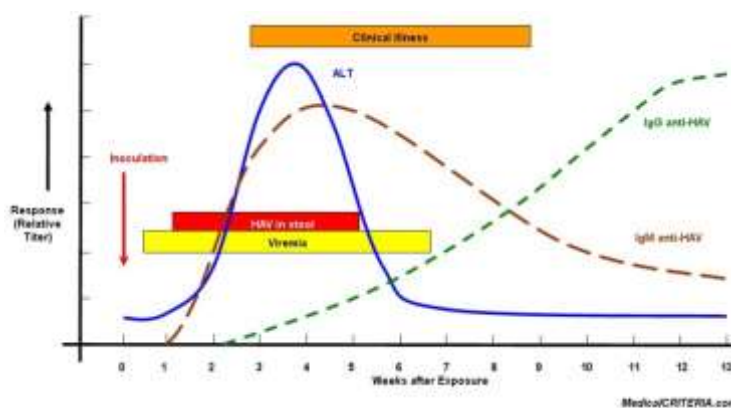
### 7.3. Vírus da Rubéola

A rubéola é altamente contagiosa e produz febre e erupção cutânea em crianças e adultos. Pode ocorrer disseminação transplacentária durante o primeiro trimestre e originar sérias consequências para o feto, tais como malformações e cerebrais. O rastreio pré-natal de rotina para a IgG anti-rubéola materna permite provar a presença de imunidade por infecção antiga ou vacinação. A pesquisa da IgM anti-rubéola permite estabelecer a diferença entre uma primo-infecção perigosa de uma reinfeção sem perigo com elevação somente das IgG.<sup>3,7</sup>

### 7.4. Vírus da Hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV) é transmitido por via fecal-oral. Ocorre principalmente devido à ingestão de água ou alimentos contaminados. A doença aguda em crianças é leve e, muitas vezes assintomática, enquanto nos adultos ocasionalmente pode desenvolver infecção grave, mas a hepatite fulminante e a morte são raras. A recuperação é completa, não existindo estado infeccioso crônico e atualmente existem vacinas eficazes contra o HAV.<sup>3</sup>

O HAV é detetado através de exames serológicos específicos para as IgM e IgG anti-HAV. Os anticorpos IgG anti-HAV aparecem no soro pouco depois das IgM, como pode ser observado na figura 2, e persistem toda a vida. Além dos achados clínicos compatíveis com a doença, a presença da IgM anti-HAV permite o diagnóstico de infecção aguda.<sup>3,6,7</sup>



**Figura 2** – Curso serológico da hepatite A. (Acedido em <http://www.medicalcriteria.com>).

### 7.5. Vírus da Hepatite B

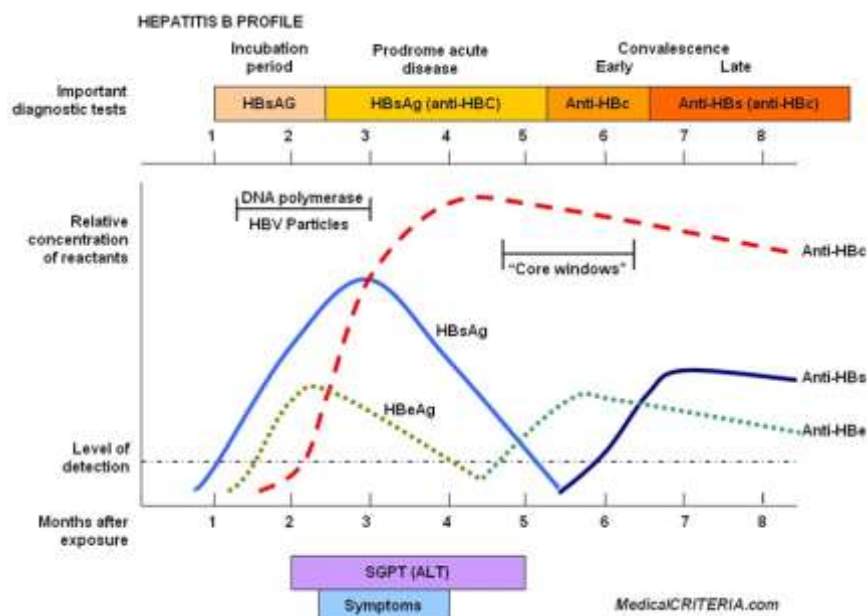
O vírus da hepatite B (HBV) é transmitido via transplacentária durante a gravidez, por contacto sexual e através do sangue por transfusões, partilha de agulhas e acidentes de trabalho com objetos cortantes contaminados. A infecção aguda é frequentemente

sintomática, com a maior parte dos danos no fígado causados pelos linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>.<sup>3</sup>

O diagnóstico da infeção aguda baseia-se na presença de anticorpos IgM para o antígeno do core (anti-HBc) ou da presença do antígeno de superfície (HBsAg) do vírus. A cura é anunciada pelo aparecimento de anticorpos contra o antígeno “e” (anti-HBe), indicando o fim da replicação viral. Como pode ser observado na figura 3, o HBsAg desaparece um pouco depois e surgem os anticorpos anti-HBs de classe IgM, posteriormente substituídos pelos anticorpos de classe IgG, que persistem durante muitos anos após a cura. Entre o desaparecimento do HBsAg e o aparecimento dos anticorpos anti-HBs pode existir um período em que apenas o marcador anti-HBc está presente.<sup>3,7</sup>

O HBV também pode persistir como uma infeção crónica e o diagnóstico é baseado na ausência da IgM anti-HBc e na presença do HBsAg e do antígeno “e” do vírus (HBeAg). Os anti-HBc do tipo IgG persistem e a presença do HBeAg testemunha uma replicação viral ativa. Os danos dos hepatócitos pelos linfócitos T permanecem na infeção crónica, pelo que a inflamação pode progredir para cirrose em pelo menos 2% dos casos. Por sua vez, a cirrose induzida por HBV é um fator de risco para carcinoma hepatocelular.<sup>3,7</sup>

Com o objetivo de classificar o tipo de doença, o HBV requer a deteção dos antígenos e dos anticorpos para os vários antígenos. A infeção por HBV e as sequelas são evitáveis através da vacinação. A eficácia da vacinação é avaliada pelo título de anticorpos anti-HBs.<sup>3,6,7</sup>



**Figura 3** – Curso de tempo da evolução da resposta imunitária e dos antígenos presentes num doente que recupera de uma infeção aguda de hepatite B. (Acedido em <http://www.medicalcriteria.com>).

### **7.6. Vírus da Hepatite C**

O vírus da Hepatite C (HCV) é transmitido essencialmente por exposição percutânea, mas a transmissão durante a gravidez ou por meio do contacto sexual e familiar é muito menos eficiente do que a transmissão do HBV e do HIV. A hepatite aguda fulminante e fatal é rara. Cerca de 80% das infeções tornam-se crónicas, levando a fibrose hepática e regeneração hepatocelular que pode progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular. A co-infeção com o HIV ou HBV, bem como o uso de álcool, acelera o seu curso natural e a superinfeção com HAV pode provocar hepatite fulminante.<sup>3</sup>

Os testes para a deteção dos anticorpos são utilizados para diagnosticar a doença crónica da hepatite C. Os falsos negativos podem ocorrer numa imunossupressão severa ou no início da infeção aguda. Resultados muito elevados de anti-HCV em relação ao valor de *cut-off* têm elevada probabilidade de indicar infeção crónica, enquanto resultados pouco acima do *cut-off* são muitas vezes falsos positivos e necessitam de confirmação.<sup>3,6</sup>

### **7.7. Vírus da Imunodeficiência Humana**

O HIV infeta e destrói os linfócitos T CD3/4<sup>+</sup> e, eventualmente, conduz à infeções oportunistas. O HIV-1 é um retrovírus com distribuição mundial. Por sua vez, o HIV-2 é encontrando predominantemente na África Ocidental e possui menor risco de transmissão e progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA).<sup>3</sup>

Durante a infeção aguda, a carga viral do HIV em circulação é elevada, mas o anticorpo pode não ser detetado e metade das pessoas apresentam sintomas semelhantes à mononucleose antes de entrar na fase assintomática. O tempo médio para que a destruição dos linfócitos CD3/4<sup>+</sup> seja suficiente para desenvolver todas as características da SIDA é de 10 a 11 anos. No entanto, alguns doentes podem desenvolver SIDA dentro de 3 anos, enquanto outros mantêm os níveis sanguíneos dos linfócitos CD3/4<sup>+</sup> estáveis e permanecem assintomáticos por tempo indeterminado. As crianças infetadas por transmissão vertical frequentemente demonstram progressão acelerada se não forem tratadas.<sup>3</sup>

Os ensaios de quarta geração combinam a deteção dos anticorpos anti-HIV e do antigénio p24 do HIV e possuem maior sensibilidade na deteção de uma infeção recente. Assim, o ensaio deteta os anticorpos anti-HIV-1 do grupo M e O, os anticorpos anti-VIH-2 e o antigénio p24. Há uma relação direta entre a quantidade de anticorpos e/ou dos antigénios p24 no soro e a quantidade de unidades relativas de luz detetadas pelo equipamento ADVIA Centaur XP. Um resultado reativo ou não reativo é determinado de acordo com o valor do *cut-off* estabelecido.<sup>3,11</sup>

No laboratório AVELAB, se o resultado obtido é positivo, seguidamente realiza-se um teste imunocromatográfico. Este teste permite distinguir qual o tipo de HIV presente na amostra (HIV-1 ou HIV-2). Para confirmação do resultado é colhida uma nova amostra e esta é enviada para outro laboratório. Caso o resultado seja positivo, o médico do doente é contactado e informado, de modo a que possa preparar o doente para o resultado.

### **7.8. *Toxoplasma gondii***

O agente etiológico da toxoplasmose é o *Toxoplasma gondii* (Toxo), um protozoário que tem uma distribuição mundial em humanos e em animais domésticos e selvagens, especialmente carnívoros. A infeção em pessoas imunocompetentes é geralmente assintomática, mas os doentes imunodeprimidos podem sofrer sérias complicações. Os seres humanos adquirem a infeção com *T. gondii* por ingestão de carne mal cozida com quistos ou pela ingestão de ooquistos esporulados através de material contaminado com fezes de gato.<sup>3</sup>

A infeção congénita pode ocorrer quando a mãe desenvolve infeção aguda durante a gestação e a gravidade da infeção depende do tempo de gestação em que é adquirida. Se a infeção é adquirida na primeira metade da gravidez pode ocorrer a morte intrauterina, microcefalia, hidrocefalia com calcificações intracranianas. As infeções na segunda metade são geralmente assintomáticas no nascimento, embora possa ocorrer febre, hepatoesplenomegália e icterícia e após meses ou anos pode surgir corioretinite, atraso psicomotor e distúrbios convulsivos.<sup>3</sup>

Os anticorpos aparecem uma a duas semanas após infeção e atingem o pico em seis a oito semanas. O teste para as IgM anti-Toxo são especialmente úteis para o diagnóstico da infeção congénita e aguda. No entanto, pode ocorrer a persistência das IgM anti-Toxo por um ano ou mais tempo, pelo que devem ser interpretadas em conjunto com os resultados das IgG anti-Toxo. O teste de avididade da IgG pode auxiliar na distinção de infeção recente ou antiga. Por sua vez, os doentes imunodeprimidos, quando têm infeção ativa apresentam quase sempre níveis pré-existentes de IgG anti-Toxo, embora possam ser baixos, e as IgM anti-Toxo são raramente detetadas.<sup>3</sup>

### **7.9. *Helicobacter pylori***

A *H. pylori* é encontrada no trato gastrointestinal e pode ser transmitida por via oral-oral ou fecal-oral. A infeção por *H. pylori* pode originar sintomas de gastrites agudas e a maioria dos doentes infetados desenvolvem a gastrite crónica ativa, o que pode levar a dispepsia não ulcerosa ou úlceras duodenais. A infeção com *H. pylori* tem sido associada com

o carcinoma gástrico, linfoma gástrico, 90% das úlceras duodenais e com quase todas as úlceras gástricas. A prevalência da gastrite associada a *H. pylori* aumenta com a idade.<sup>3</sup>

Os ensaios serológicos são utilizados em doentes sintomáticos para detetar anticorpos contra *H. pylori*. No entanto, este teste pode não ser específico, pois a maioria dos adultos já terão sido expostos a *H. pylori*. A deteção do antígeno da *H. pylori* nas fezes é uma alternativa não invasiva para o diagnóstico da infeção.<sup>3</sup>

No laboratório AVELAB é realizado um teste qualitativo, através de um teste imunocromatográfico, para a deteção dos anticorpos IgG e IgM específicos contra a *H. pylori*. No entanto, este não permite diferenciar entre infeção ativa ou passada. Assim, na pesquisa da IgM, se o resultado obtido é positivo, a amostra é enviada para outro laboratório para ser analisada. Além deste teste, no sector de Microbiologia é realizado um teste imunocromatográfico para pesquisar o antígeno nas fezes.

## **8. Alergias**

As reações de hipersensibilidade do tipo I são induzidas por certos tipos de antígenos, designados de alérgenos, e tem todas as características de uma resposta humoral normal. O que distingue uma resposta de hipersensibilidade de tipo I de uma resposta humoral normal é que as células segregam imunoglobulina E (IgE) que, por sua vez, desencadeia a inflamação alérgica. Os imunoenaios no soro para a IgE total e IgE específica do alérgeno podem ser utilizados na avaliação das doenças alérgicas.<sup>3,5</sup>

### **8.1. IgE total e IgE específica**

A quantificação da IgE total no soro pode ser utilizada clinicamente como um teste de rastreio para o diagnóstico de várias doenças alérgicas. Também possui um valor preditivo como um indicador da probabilidade de desenvolvimento da doença alérgica em lactentes e crianças assintomáticas e no prognóstico em adultos com certos tipos de doenças alérgicas crónicas. Além disso, pode ser útil na avaliação de doentes suspeitos de terem doenças de imunodeficiência, doenças parasitárias ou síndrome de hiper-IgE.<sup>3</sup>

Por sua vez, a IgE específica pode ser utilizada para avaliar crianças com sinais clínicos iniciais da doença alérgica (eczema, sintomas gastrointestinais e rinite) e crianças e adultos com suspeita de doença respiratória alérgica. Também permite avaliar a sensibilidade ao veneno dos insetos e as alergias ocupacionais, aos medicamentos e aos alimentos.<sup>3</sup>

## **9. Autoimunidade**

À autoimunidade tem sido definida como a incapacidade de um organismo em reconhecer o seu próprio tecido saudável, mas também pode ser definida pela presença de autoanticorpos e/ou células T que reagem contra os autoantígenos. Assim, a autoimunidade pode induzir lesão imunológica no hospedeiro e originar doenças, tais como, a tiroidite autoimune e o lúpus eritematoso sistêmico.<sup>3</sup>

No laboratório AVELAB os testes de autoimunidade são realizados uma vez por semana, de modo a reunir um volume suficiente de amostras para realizar as análises.

### **9.1. Doenças reumáticas sistémicas**

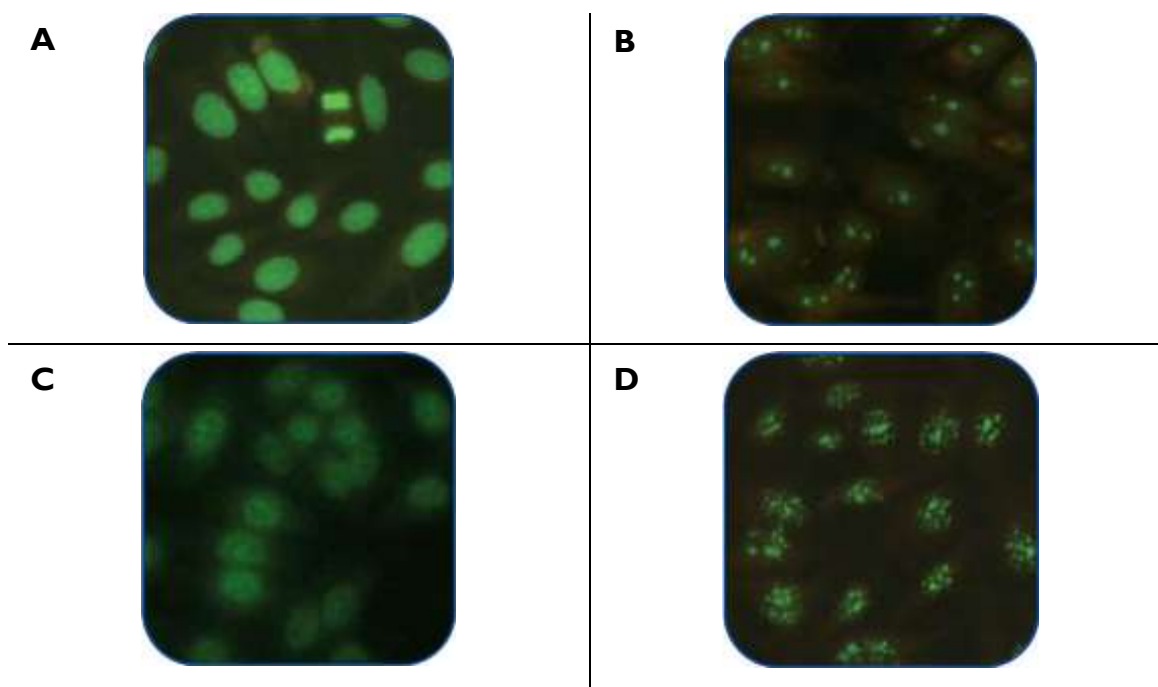
As doenças reumáticas são caracterizados pela presença de um ou mais anticorpos que podem ser direcionados contra os componentes das células: superfície, citoplasma, membrana nuclear ou núcleo. Muitas das doenças reumáticas apresentam um perfil distinto de autoanticorpos com implicações de diagnóstico e de prognóstico.<sup>3</sup>

#### **9.1.1. Anticorpos antinucleares**

Os anticorpos antinucleares reconhecem os antígenos dos núcleos e são uma característica das doenças reumáticas sistémicas.<sup>3,7</sup>

A pesquisa dos anticorpos antinucleares é realizada por imunofluorescência indireta, utilizando como suporte células HEp-2, onde os anticorpos séricos reagem especificamente com várias proteínas celulares e ácidos nucleicos. A fixação dos anticorpos sobre os núcleos pode ser observada com um microscópio de imunofluorescência, graças as anti-imunoglobulinas humanas fluorescentes. A fluorescência obtida pode apresentar vários padrões distintivos dos anticorpos antinucleares e na figura 4 podem ser observados alguns exemplos: homogéneo, mosqueado, nucleolar e centrómero. O aspeto da fluorescência permite indicar a natureza dos anticorpos presentes. Por exemplo, um padrão mosqueado indica a presença de anticorpos dirigidos contra os antígenos nucleares extraíveis (ENA). A diluição do soro permite titular os anticorpos.<sup>3,7</sup>

Na preparação das lâminas de substrato células HEp-2, o primeiro e o segundo poço da primeira lâmina são reservados para o controlo positivo e controlo negativo, respetivamente. A visualização das lâminas é realizada no microscópio Olympus CX41 com a objetiva de 40x.



**Figura 4** – Imunofluorescência indireta com anticorpos antinucleares em células HEp-2:

A – Padrão homogêneo; B – Padrão nucleolar; C – Padrão mosqueado; D – Padrão centrómero. (Acedido em <http://www.menarinidiag.pt>).

### 9.1.2. Anticorpos anti-SS-B/La e anti-SS-A/Ro

Os anti-ENA são um grupo de anticorpos dirigidos contra os antígenos nucleares solúveis. Os anticorpos específicos para estes antígenos possuem individualmente diferentes valores de diagnóstico.<sup>3,7</sup>

No laboratório AVELAB é realizado o rastreio dos anticorpos anti-ENA através dos seguintes antígenos: UI-snRNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, centrómero e Jo-1. No entanto, apenas é realizada a pesquisa específica dos anticorpos anti-SS-B/LA e anti-SS-A/Ro.

Os doentes com lúpus eritematoso sistémico podem ter apenas os anticorpos anti-SS-A/Ro, ou podem ter os anticorpos anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La. A presença de apenas anti-SS-A/Ro é associada ao antígeno leucocitário humano DR2 (HLA-DR2), início da doença com idade inferior a 22 anos e em comparação com os doentes com lúpus eritematoso sistémico que apresentam os dois anticorpos, estes possuem uma maior incidência de anticorpos anti-DNA concomitantes. Por sua vez, a presença dos dois anticorpos no lúpus eritematoso sistémico é associado ao HLA-DR3 e é observado em doentes mais velhos.<sup>3</sup>

Os anticorpos anti-SS-A/Ro têm sido associados com o aparecimento de nefrite, vasculite, linfadenopatia, fotossensibilidade e leucopenia em doentes com lúpus eritematoso sistémico. Os anticorpos anti-SS-B/La são notáveis pela sua forte associação com a síndrome de Sjögren, em semelhança aos anticorpos anti-SS-A/Ro.<sup>3</sup>

### **9.1.3. Anticorpos anti-DNA de dupla cadeia**

Os anticorpos anti-DNA de dupla cadeia (anti-dsDNA) são bastante específicos para o lúpus eritematoso sistêmico e desempenham um papel definitivo na patogênese da doença. Os complexos formados pelo anticorpo anti-dsDNA e o antígeno do DNA são depositado nos glomérulos do rim, iniciando danos nos rins através de mecanismos inflamatórios. Estes anticorpos estão relacionados com a evolução do lúpus eritematoso sistêmico e constituem um critério de diagnóstico.<sup>3,7</sup>

Os anti-dsDNA podem estar presentes em doentes com artrite reumatóide, no entanto os clínicos têm de estar cientes que o tratamento da artrite reumatoide com infliximab, um anticorpo monoclonal anti-factor necrose tumoral (anti-TNF), pode aumentar os níveis dos anti-dsDNA no soro.<sup>3,12</sup>

### **9.1.4. Anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico IgG**

O FR e o anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) são dois marcadores utilizados no diagnóstico da artrite reumatoide. Os anti-CCP podem ser detetados em 50% dos doentes com artrite reumatoide inicial, num momento em que o FR é negativo, o que permite um diagnóstico e intervenção terapêutica precoce. O anti-CCP é mais específico que o FR, mas apesar da elevada especificidade de ambos, estes anticorpos podem ser detetados em outras doenças. Os anticorpos anti-CCP são raramente encontrados em outras condições clínicas, tais como, hepatite C, doença de Lyme, doença de Graves, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjögren.<sup>3,12</sup>

### **9.1.5. Anticorpos anti-cardiolipina IgG e IgM**

A síndrome dos anticorpos antifosfolipídicos é caracterizada pela presença de anticorpos em circulação para os fosfolípidos e das características clínicas, como trombozes arteriais e venosas, trombocitopenia, anemia hemolítica e abortos. Os anticorpos antifosfolipídicos são encontrados até 60% dos doentes com lúpus eritematoso sistêmico, mas também podem ocorrer em outras desordens, tais como as doenças infecciosas. A cardiolipina (fosfolípido aniónico) tem sido amplamente utilizada para a deteção dos anticorpos antifosfolipídicos que podem ser das classes IgG ou IgM.<sup>3</sup>

## **9.2. Doença Celíaca**

A doença celíaca é um distúrbio desencadeado pela ingestão de glúten, em indivíduos geneticamente predispostos. O trigo e outros cereais semelhantes que contêm esta proteína podem induzir danos na mucosa do intestino, causando atrofia não específica das vilosidades



da mucosa do intestino delgado. Alguns doentes permanecem assintomáticos, mas este transtorno pode ocorrer quando os doentes apresentam anemia por deficiência de ferro, perda de peso e diarreia. Em casos graves, pode ocorrer má absorção e esteatorreia. Outras doenças podem estar associadas com a doença celíaca, tais como, a diabetes *mellitus* tipo 1, síndrome de Down, dermatite herpetiforme, deficiência de imunoglobulina A (IgA) e doença autoimune da tiróide.<sup>3</sup>

### **9.2.1. Anticorpos anti-transglutaminase tecidual IgG e IgA**

Os testes serológicos são utilizados para ajudar no diagnóstico de doença celíaca. Estes incluem a pesquisa de anticorpos anti-transglutaminase IgA. Os resultados dos testes serológicos devem ser analisados com cautela, porque esta doença está associada à deficiência seletiva de IgA, que dará origem a resultados falsos negativos. Assim, os níveis totais da IgA ou os anticorpos específicos da classe IgG deverão ser determinados quando há suspeita clínica da doença celíaca.<sup>3</sup>

## **9.3. Doenças da tiróide**

As doenças autoimunes da tiróide alteram a função da glândula e incluem a doença de Graves e tireoidite de Hashimoto. Os autoanticorpos ou os linfócitos T sensibilizados ligam-se a membranas de células da tiróide, o que origina a lise celular e as reações inflamatórias. Os autoantígenos da tiróide que são responsáveis pelos distúrbios autoimunes incluem a peroxidase da tiróide e a tiroglobulina.<sup>3</sup>

### **9.3.1. Anticorpos anti-peroxidase da tiróide**

O anticorpo anti-peroxidase da tiróide (anti-TPO) é dirigido contra um antígeno que está contido dentro da fração microssomal do citoplasma das células epiteliais da tiróide. O anti-TPO pode ser detetado no soro de doentes com doença de Graves ou tireoidite de Hashimoto e os seus níveis estão fortemente correlacionados com a doença clinicamente ativa. Os anticorpos anti-TPO estão envolvidos no processo destrutivo do tecido.<sup>3</sup>

### **9.3.2. Anticorpos anti-tiroglobulina**

O anticorpo anti-tiroglobulina (anti-TG) é direcionado contra a tiroglobulina, que é armazenada dentro dos folículos da glândula tiróide. Estes anticorpos auxiliam no diagnóstico da tireoidite de Hashimoto. Em áreas deficientes em iodeto, a quantificação dos anti-TG no soro pode ser utilizado para detetar a doença autoimune da tiróide em doentes com bócio e para avaliar a terapia com iodeto em áreas endémicas.<sup>3</sup>

## **VIII. Microbiologia**

Ao sector de Microbiologia podem chegar uma diversidade de produtos biológicos, nomeadamente urina, fezes, exsudados genitais, nasofaríngeos, auriculares e de feridas, expetoração, cabelos, unhas e hemoculturas. As análises processadas neste sector a nível bacteriológico, parasitológico e micológico, procuram auxiliar no diagnóstico e na terapêutica. Estas são distribuídas por 6 técnicos, requerendo um cuidadoso trabalho manual e especializado por parte deles.

Durante o período que permaneci neste sector, tive a oportunidade de aprender, praticar e aperfeiçoar diferentes técnicas manuais. Realizei tarefas como a observação de esfregaços de amostras à fresco e fixas pelas colorações de Gram e/ou Ziehl-Neelsen, a análise sumária da urina ou urina tipo II, a inoculação de meios de cultura, com identificação, contagem de colónias e realização dos respetivos antibiogramas e a identificação de fungos.

Neste relatório desenvolverei mais pormenorizadamente as áreas de bacteriologia e micologia, uma vez que foram as áreas que tive um maior contacto durante o período de estágio.

### **I. Exame microscópico direto**

Todas as amostras recebidas requerem um exame microscópico direto, pois este exame permite avaliar a qualidade da amostra, dar uma indicação do que pode estar errado com o doente e analisar as características morfológicas das bactérias (forma e afinidade para os corantes). Além disso, o processamento da amostra pode ser orientado por comparação entre o que cresce em cultura e o que foi visto no esfregaço.<sup>6,13</sup>

No laboratório AVELAB é efetuado o exame a fresco das amostras e alguns métodos para auxiliar na identificação de bactérias ou fungos, como as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen e o método do hidróxido de potássio (KOH).

#### **I.1. Exame a fresco**

O produto é colocado entre uma lâmina e lamela e é observado ao microscópio, permitindo apreciar a presença de elementos celulares e microrganismos (bactérias, fungos e parasitas).<sup>13</sup>

#### **I.2. Coloração de Gram**

A coloração de Gram ajuda a visualizar as bactérias, os glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e células epiteliais escamosas presentes na amostra. As células bacterianas são

avaliadas em relação a sua coloração, morfologia (por exemplo, cocos ou bacilos) e tipo de agrupamento. A coloração de Gram também permite detetar a maioria dos fungos.<sup>6</sup>

Esta coloração baseia-se na diferença da composição das paredes das bactérias Gram-positivo e das bactérias Gram-negativo. As bactérias Gram-positivo retêm o corante violeta de cristal, enquanto nas bactérias Gram-negativo este corante é facilmente removido pelo descorante (álcool-acetona). Assim, as bactérias Gram-positivo coram de roxo escuro e as Gram-negativo de vermelho ou rosa com o corante de contraste (safranina ou fucsina diluída), pois embora este possa ser absorvido pelas bactérias Gram-positivo, a sua aparência roxa não é alterada.<sup>6,13</sup>

### **1.3. Coloração de Zielh-Neelsen**

Esta coloração é usada especificamente para um subconjunto de bactérias cujas paredes celulares contêm ácidos micólicos, tornando estas resistentes à descoloração álcool-ácido. As micobactérias são as bactérias mais vulgarmente encontradas com esta característica, como por exemplo, a *Mycobacterium tuberculosis*. As bactérias que não possuem paredes celulares com ácidos micólicos não resistem à descoloração com álcool-ácido, sendo uma característica da maioria das outras bactérias clinicamente relevantes. Os microrganismos álcool-ácido resistentes coram de vermelho com o corante primário, enquanto as células do hospedeiro e outros microrganismos coram de azul com o corante de contraste (azul de metileno).<sup>6</sup>

### **1.4. Método do hidróxido de potássio**

O KOH permite clarear as amostras tornando as estruturas fúngicas mais visíveis. Assim, este método permite a deteção rápida dos elementos fúngicos em amostras de escamas de pele, pelos, cabelos e unhas.<sup>6,14</sup>

## **2. Meios de Cultura**

Os meios de cultura proporcionam as condições ótimas para o crescimento dos agentes patogénicos vulgarmente encontrados num tipo de amostra. Estes permitem o crescimento, o isolamento, a identificação e a caracterização dos microrganismos presentes na amostra clínica. Além disso, os meios de cultura possibilitam diferenciar entre os microrganismos mais propensos de causar infeção e os prováveis colonizadores ou contaminantes.<sup>3,6</sup>

As bactérias patogénicas geralmente multiplicam-se melhor a temperaturas semelhantes às dos tecidos internos e dos órgãos dos hospedeiros. Assim, a incubação das

placas de cultura para desenvolvimento das bactérias de interesse clínico é realizada com temperaturas compreendidas entre 35° e os 37°C. A adição de 5% a 10% de dióxido de carbono pode ser essencial ou estimuladora no crescimento de *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. As culturas são examinadas inicialmente após 18 a 24 horas de incubação.<sup>3,6</sup>

Relativamente à cultura de fungos, as placas devem ser incubadas a 30°C durante 21 a 30 dias, antes dos resultados serem reportados como negativos. Durante o período incubação, as culturas deverão ser examinadas ao longo do tempo.<sup>6</sup>

No laboratório AVELAB utiliza-se diferentes meios de cultura, consoante o tipo de amostra e/ou através do que foi observado no exame microscópico direto. Os diferentes meios utilizados encontram-se descritos na tabela 3.

**Tabela 3 – Meios utilizados no laboratório AVELAB e sua finalidade.**<sup>6,13,15</sup>

Meios de Cultura	Finalidade
Agar bÍlis esculina	Isolamento diferencial e identificação presuntiva de <i>Streptococci</i> grupo D e <i>Enterococcus</i> spp..
Agar Salmonella-Shigella	Meio seletivo e diferencial para o isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp..
Gelose de Cistina-Lactose-Deficiente de Electrólitos	Meio não seletivo e diferencial que permite o isolamento dos agentes mais frequentes das infeções urinárias.
ChromID Strepto B	Meio cromogénico para rastreio de <i>Streptococcus agalactiae</i> em amostras vaginais/retais.
Gelose de sangue	Meio não seletivo que permite o crescimento de microrganismos fastidiosos e observação de reações hemolíticas.
Gelose de chocolate + PolyViteX	Meio enriquecido e não seletivo que favorece o crescimento de <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Neisseria</i> spp..
Gelose de chocolate Haemophilus 2	Meio de chocolate com agente seletivo que favorece o crescimento de <i>Haemophilus</i> spp. nos produtos com flora mista.
Gelose de Levine	Meio de isolamento e de diferenciação entre bacilos entéricos não fermentadores e fermentadores da lactose.
Gelose de Manitol Salgado	Meio seletivo para o isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. e identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i> .

Gelose Mueller-Hinton	Meio não seletivo usado para o estudo da suscetibilidade aos antimicrobianos.
Gelose de Sabouraud com cloranfenicol	Meio próprio para os fungos.
Löwenstein-Jensen	Meio próprio para as micobactérias.
Caldo Brain-Heart Infusion	Meio não seletivo, geralmente utilizado como meio de enriquecimento.
Caldo tetrionato	Meio seletivo para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp..
Caldo Todd-Hewitt	Meio seletivo e de enriquecimento para <i>S. agalactiae</i> .

### 3. Provas de identificação

A determinação das capacidades nutricionais e metabólicas dos microrganismos auxilia na identificação do gênero e espécie. Através de uma combinação de testes podem ser avaliadas as capacidades enzimáticas de um determinado isolado bacteriano, bem como a capacidade de crescimento ou sobrevivência na presença de certos inibidores.<sup>6</sup>

Ao longo do meu estágio tive a oportunidade de realizar diferentes provas de identificação representadas na tabela 4.

**Tabela 4** – Testes utilizados para auxiliar na identificação dos microrganismos.<sup>6,13,14</sup>

Testes	Finalidade
Kligler	
Citrato	Identificação bioquímica presuntiva das <i>Enterobacteriaceae</i> através de um número reduzido de substratos.
Indol	
Urease	
Oxidase	Diferenciação entre os grupos de bactérias Gram-negativo, pelo que a <i>Pseudomonas</i> spp. são oxidase positiva. O teste também auxilia na identificação da <i>Neisseria</i> spp. (oxidase positiva).
Catalase	Diferenciação das bactérias Gram-positivo. Os estafilococos são catalase positiva, ao passo que os estreptococos e enterococos são catalase negativa.
Coagulase	Diferenciação entre <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase-positiva) dos estafilococos coagulase-negativa.
Bacitracina	Teste de diagnóstico presuntivo para <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolítico do grupo A ( <i>Streptococcus pyogenes</i> ), o qual é inibido na gelose de sangue na presença

	de um disco de bacitracina a 0,04 U. O <i>Streptococcus</i> β-hemolítico não pertencente ao grupo A não forma halo de inibição.
Novobiocina	O <i>Staphylococcus saprophyticus</i> é resistente à novobiocina, enquanto outras estirpes de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa são suscetíveis.
Optoquina	A optoquina inibe o crescimento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , originando um halo de inibição da cultura em placa. Os streptococci α-hemolíticos são resistentes.
Fatores V e X	Os membros do género <i>Haemophilus</i> requerem fatores de crescimento <i>in vitro</i> : hemina (fator X) e NAD (fator V). O <i>Haemophilus influenzae</i> cresce em torno do disco XV, enquanto o <i>Haemophilus parainfluenzae</i> cresce à volta dos discos XV e V.
Tubo germinativo	Caracterização presuntiva das leveduras do género <i>Candida</i> . Quando positivo permite a identificação de <i>Candida albicans</i> .

#### 4. Antibiogramas

O antibiograma tem como objetivo testar a sensibilidade bacteriana aos antibióticos. O antibiograma deve ser realizado para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana. Além disso, estes testes estão indicados quando o microrganismo pertence a uma espécie capaz de exibir resistência aos antimicrobianos.<sup>7,13</sup>

No laboratório AVELAB é realizado o antibiograma através do método de Kirby-Bauer. Os antimicrobianos utilizados para as diferentes bactérias, de acordo com o protocolo do laboratório, encontram-se descritos em anexo. Estes são escolhidos de acordo com as Normas da Direção-Geral da Saúde e com as recomendações da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*.

O método de difusão de disco é adequado para testar a sensibilidade da maioria das bactérias patogénicas, incluindo as bactérias exigentes mais comuns e quase todos os agentes antimicrobianos podem ser testados. Este método pode ser utilizado para as seguintes bactérias: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus* spp..<sup>13,16</sup>

Na realização do antibiograma devem ser utilizadas colónias isoladas, obtidas a partir de uma cultura pura. A preparação do inóculo é efetuada pelo método direto da suspensão das colónias e a densidade da suspensão pode ser comparada visualmente com um padrão de turvação de McFarland a 0,5. A suspensão bacteriana padronizada é depois inoculada na superfície do meio de Mueller-Hinton, onde se colocam os discos impregnados em

antimicrobianos. A partir dos discos o antimicrobiano difunde-se no gel e a sua concentração diminui à medida que se afasta do centro. Após incubação são medidos os diâmetros dos halos de inibição de crescimento para cada disco, pelo que o resultado qualitativo é expresso como sensível, intermédio ou resistente. Quanto maior for o diâmetro, maior é a sensibilidade do isolado bacteriano.<sup>7,13,16</sup>

## 5. Urinas

As infeções do trato urinário podem ser causadas por fungos ou bactérias e podem ocorrer no trato urinário superior ou inferior. Além disso, estas podem ser assintomáticas ou sintomáticas. As infeções do trato urinário estão entre as infeções bacterianas mais comuns que levam as pessoas a procurar cuidados médicos.<sup>6,17</sup>

A prevalência das infeções urinárias é dependente da idade e sexo, sendo mais frequente nas mulheres. Uma vez que a uretra das mulheres é mais curta, as bactérias atingem a bexiga mais facilmente. Além disso, estas infeções constituem uma das principais complicações da diabetes, da doença renal, do transplante renal, das anormalidades estruturais e neurológicas que interferem com o fluxo de urina.<sup>6</sup>

Numa pessoa saudável, todas as áreas do trato urinário acima da uretra são estéreis, tal como a urina. No entanto, os métodos não invasivos para a colheita da urina obtêm uma amostra que passou através de um ambiente contaminado, uma vez que a passagem da urina através da uretra arrasta os microrganismos que a colonizam e, conseqüentemente, pode induzir erros na interpretação da urocultura. Assim, as culturas quantitativas são usadas para discriminar entre colonização, contaminação e infeção.<sup>6,13</sup>

Os agentes etiológicos mais frequentes em crianças e adultos saudáveis são as *Enterobacteriaceae*, principalmente a *Escherichia coli*. Em doentes internados e com fatores de risco como algaliação permanente, cálculos urinários e outras patologias do aparelho urinário, outros agentes etiológicos também podem originar infeções, tais como, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp.* e fungos, estes últimos particularmente em doentes que estão sob terapêutica antibiótica. A *Candida albicans* é o fungo patogénico oportunistas mais comum que provoca infeções nosocomiais no trato urinário.<sup>13,17</sup>

### 5.1. Colheita

Nos adultos deve ser colhido o jato intermédio da primeira urina da manhã, ou se impossível, colher a urina após ter estado pelo menos duas horas sem urinar. Antes de iniciar a colheita lavar bem as mãos e em seguida a região urogenital com água e sabão,

removendo depois com água e secar. O jato intermédio é colhido diretamente para recipiente esterilizado após desperdiçar a primeira porção do jato urinário.<sup>13</sup>

Nas crianças sem controlo dos esfíncteres, a urina deve ser colhida para um saco coletor. Antes de colocar o saco coletor, lavar com água e sabão a área genital. Depois de secar, aplicar corretamente o saco estéril e se ao fim de 30 minutos não tiver urinado, retira-se o saco e repete-se o processo. Após a micção, a urina é transferida para um recipiente esterilizado.<sup>13</sup>

## 5.2. Urianálise – Aution MAX AX-4030

A urianálise permite dar uma indicação do estado do sistema renal e geniturinário da pessoa e avaliar outros sistemas do corpo. Os equipamentos automáticos que leem as tiras de reagente de análise química da urina permitem eliminar o erro humano e diminuir o trabalho e o tempo de processamento, sendo mais viáveis hoje em dia para o alto volume de trabalho do laboratório.<sup>18</sup>

No laboratório AVELAB, as amostras de urina que requerem análise sumária de urina ou urina tipo II são primeiro processadas no analisador automático Aution MAX AX-4030



(Figura 5). Os métodos de leitura do equipamento, segundo o manual do equipamento, e os parâmetros determinados encontram-se descritos na tabela 5. As tiras de testes permitem determinar os seguintes parâmetros: glicose, proteína, bilirrubina, urobilinogénio, pH, hemoglobina, corpos cetónicos, nitritos e leucócitos.

**Figura 5** – Aution MAX AX-4030. (Acedido em <http://www.menarinidiag.pt/>).

**Tabela 5** – Métodos de leitura do Aution MAX AX-4030 e as respetivas análises.

Método de leitura	Análise
Reflectância bicromática (exceção: comprimento de onda único para o sangue)	Tira de teste
Refractometria por reflexão	Densidade
Reflexão da luz	Cor
Dispersão da luz	Turvação



### 5.3. Exame direto e cultural

O exame direto é realizado através da observação do sedimento urinário a fresco e do esfregaço de urina corado pela coloração de Gram. Após centrifugação da urina, o exame direto a fresco do sedimento urinário é realizado através da observação de elementos celulares (células epiteliais, leucócitos e eritrócitos), fungos ou parasitas. Um sedimento normal contém raras células epiteliais, cristais, poucos leucócitos e eritrócitos, não estando presentes microrganismos nem cilindros granulosos.<sup>7,13</sup>

O exame direto permite orientar a escolha dos meios apropriados para semear a urina, pelo que podem ser utilizados os seguintes meios: levine, Cistina-Lactose-Deficiente de Electrólitos (CLED), manitol salgado, agar bilis esculina, ChromID Strepto B (STRB) e Sabouraud.

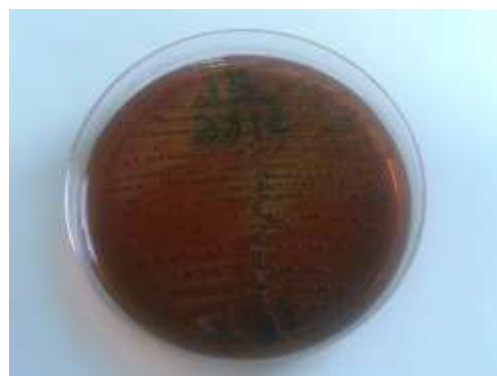
### 5.4. Interpretação dos resultados

Após a incubação verifica-se a presença ou não de crescimento bacteriano, procedendo-se à contagem de colónias. As infeções urinárias em regra são monomicrobianas, pelo que o isolamento de várias bactérias é indicativo de contaminação da amostra.<sup>7,13</sup>

A valorização dos resultados deverá ter em conta uma série de parâmetros, tais como, método de colheita da urina, tipo de doente, sintomatologia, exame direto e resultados de exames bacteriológicos anteriores. Segundo os critérios de Kass, uma contagem de colónias  $\geq 10^5$  UFC/mL traduz uma infeção urinária. Entre  $10^3$  a  $10^5$  UFC/mL pode traduzir em certas circunstâncias uma infeção urinária, enquanto  $< 10^3$  UFC/mL exclui infeção urinária.<sup>7,13</sup>

A identificação é efetuada com base na morfologia da estripe isolada e em testes que auxiliam na sua identificação, como por exemplo, nas *Enterobacteriaceae* utilizam-se as provas de Kligler, citrato, ureia e indol. Na figura 6 podem ser observadas colónias isoladas de *E.coli* em meio de levine. Após a identificação é realizado o respetivo antibiograma.

Ao longo do meu estágio tive a oportunidade de observar vários microrganismos patogénicos nos meios de cultura, como por exemplo, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *S. aureus* e *C. albicans*.



**Figura 6** – *E.coli* em meio de levine.

## 6. Fezes

As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, com grande morbidade em crianças e idosos. Embora diarreias agudas sejam geralmente auto-limitadas, algumas pessoas requerem estudos de diagnóstico e tratamento. Na pesquisa do agente etiológico deve ser tomado em consideração os antecedentes epidemiológicos, a existência de fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia.<sup>6,13</sup>

A maioria dos agentes patogênicos entéricos (bactérias, vírus e parasitas) é adquirida pela via fecal-oral. A capacidade de um microrganismo para causar infecção depende da sua virulência e da suscetibilidade do hospedeiro. Alguns dos fatores do hospedeiro incluem higiene pessoal e idade. Além disso, uma flora intestinal normal é um fator importante de prevenção à introdução de um microrganismo potencialmente prejudicial. Os microrganismos que podem ganhar posição com a redução da flora normal incluem *Candida* spp., estafilococos, *Pseudomonas* spp., várias *Enterobacteriaceae*, *C. difficile*, em que este último é capaz de multiplicar-se e produzir toxinas.<sup>6</sup>

Os microrganismos patogênicos entéricos interagem com o hospedeiro humano e podem originar infecções no trato gastrointestinal por um ou mais mecanismos:

- Produção de toxinas: *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., *E. coli* enterotoxinogénica, *E. coli* enterohemorrágica, *Salmonella* spp., *C. difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *S. aureus* e *Bacillus cereus*;
- Adesão as células da mucosa ou perto: *E. coli* enteropatogénica, *E. coli* enterohemorrágica, *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli* e Rotavírus;
- Invasão intracelular das células da mucosa: *Shigella* spp., *E. coli* enteroinvasiva, *Entamoeba histolytica*, *C. jejuni* e *Yersinia enterocolitica*.<sup>6</sup>

### 6.1. Colheita

Para exame bacteriológico das fezes devem ser colhidas amostras do tamanho de uma noz e em dias diferentes. Se possível colher uma porção com muco, pus ou sangue. Nos casos agudos uma amostra é quase sempre suficiente.<sup>13</sup>

No exame parasitológico deve ser colhido um número de três amostras, de preferência em dias alternados.<sup>13</sup>

## **6.2. Adenovírus e Rotavírus**

No laboratório AVELAB são efetuados alguns testes imunocromatográficos para detetar especificamente a presença de antigénios de agentes patogénicos nas fezes, tais como, o adenovírus e rotavírus.

As fezes podem ser usadas para detetar rotavírus e adenovírus entéricos (serotipos 40 e 41). O adenovírus é transmitido por via respiratória, fecal-oral e por contacto direto (olhos). Os serotipos 40 e 41 causam gastroenterite em lactentes e crianças, enquanto outros serotipos originam conjuntivite e queratite. Por sua vez, o rotavírus é transmitido por via fecal-oral e sobrevive bem em objetos inanimados. Este vírus origina gastroenterites em lactentes e crianças entre os 6 meses e os 2 anos e é a principal causa de diarreia em crianças.<sup>6</sup>

## **6.3. Exame bacteriológico e micológico das fezes**

No exame direto a fresco é avaliado a presença de leucócitos e eritrócitos. Depois as lâminas são fixadas e coradas para analisar a flora predominante.<sup>7</sup>

Se eventualmente forem detetados parasitas no exame direto, estes devem ser referidos. Seguidamente, as fezes são semeadas em agar *Salmonella-Shigella* e caldo tetracionato e no dia seguinte, a partir do caldo de enriquecimento repica-se para o agar *Salmonella-Shigella*. Outros meios poderão ser utilizados, consoante o exame direto. Se solicitado o exame micológico ou a pesquisa de *S. aureus*, as fezes também são semeadas nos meios de Sabouraud e manitol salgado, respetivamente. Para pesquisa específica de outros microrganismos, as fezes são enviadas para um laboratório externo.

### **6.3.1. Interpretação dos resultados**

Na identificação de *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. é observado se ocorreu crescimento das colónias não fermentadoras de lactose com ou sem produção de H<sub>2</sub>S.<sup>13</sup>

Para auxiliar na sua identificação de *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. devem ser realizados os testes de Kligler, citrato, indol e ureia. Para confirmar a presença de *Salmonella* spp. também é realizado um teste de aglutinação em látex. Assim, em coproculturas positivas deve ser realizado o respetivo antibiograma.

Ao longo do meu estágio apenas observei uma coprocultura com *Salmonella* spp..

## **7. Exsudados uretrais, vaginais e retais**

O número de microrganismos que podem causar infeções do trato genital é vasto e incluem bactérias, vírus, fungos e parasitas. As infeções do trato genital feminino podem ser

causadas por membros da flora genital (infecções endógenas) cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita. No entanto, a grande maioria das infecções do trato genital inferior é transmitida por via sexual.<sup>6,13</sup>

Nas vaginites os principais agentes patogénicos são *Gardnerella/Mobiluncus*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*. Por sua vez, nas uretrites/cervicites os principais agentes são *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e micoplasmas.<sup>6,7</sup>

Além disso, muitas mulheres são portadoras do *Streptococcus agalactiae* que pode ser transmitido para o recém-nascido, constituindo uma das causas de infeção neonatal grave. Por isso, o rastreio de mulheres colonizadas com o *S. agalactiae* é crítico para a prevenção das infeções invasivas em recém-nascidos.<sup>6,15</sup>

### **7.1. Colheita**

Na colheita do exsudado vaginal introduz-se um espéculo e com uma zaragatoa é colhida uma amostra do fundo do saco posterior e/ou paredes vaginais. Depois repete-se a operação com uma segunda zaragatoa para a realização de esfregaços.<sup>13</sup>

A colheita do exsudado retal é realizada com uma zaragatoa, a qual é rodada contra as criptas retais. O contacto com matéria fecal deve ser evitado.<sup>13</sup>

O exsudado uretral no homem deve ser colhido, se possível, antes da primeira micção. Se não, esperar pelo menos uma hora após a última micção. Uma zaragatoa fina e flexível é introduzida até 2 cm no interior da uretra e o exsudado é recolhido com um movimento de rotação. O esfregaço para o exame direto é realizado no ato da colheita, sendo repetida a colheita com uma segunda zaragatoa para o exame cultural.<sup>13</sup>

### **7.2. Exame direto e cultural**

No exame direto é efetuado o exame a fresco e em seguida uma coloração de Gram. No exame direto a fresco observa-se a presença ou não de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes. Com a coloração de Gram é realizada a descrição da flora existente.<sup>13</sup>

Consoante o tipo de produto e o sexo do doente, o exame cultural pode ser efetuado em gelose de chocolate com polyvitex, gelose de sangue e em meio de Sabouraud.<sup>13</sup>

Na pesquisa específica de *Streptococcus* do grupo B de Lancefiel (*Streptococcus agalactiae*) em grávidas, ao colher com a mesma zaragatoa uma amostra da vagina seguida pelo reto, entre as 35 e 37 semanas de gestação, prediz com fiabilidade a sua presença no momento do parto. A zaragatoa deve ser inoculada num caldo seletivo recomendado, tal

como o caldo de Todd-Hewitt e repicar no dia seguinte em agar para isolar e identificar os estreptococos do grupo B. O meio cromogénico STRB permite o rastreio do *S. agalactiae*.<sup>6,15</sup>

Outras pesquisas específicas de outros agentes patogénicos são enviadas para um laboratório de referência, como por exemplo, a pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*.

### 7.3. Interpretação dos resultados

No exame do corrimento uretral nos homens mediante a coloração de Gram, a presença de diplococos Gram-negativos intracelulares é normalmente indicativo de gonorreia, não sendo necessário a realização da cultura. Nas mulheres os esfregaços também podem ser examinados, no entanto a flora normal vaginal pode assemelhar-se a *N. gonorrhoeae*, como a *Veillonella* ou cocobacilos Gram-negativos, pelo que as culturas de confirmação devem sempre ser realizadas.<sup>6</sup>

Relativamente aos exsudados vaginais, o exame microscópico direto proporciona o teste de diagnóstico simples e rápido para *Trichomonas vaginalis*, sob a forma de um protozoário piriforme, flagelado e muito móvel.<sup>6,7</sup>

A coloração de Gram permite diferenciar a vaginose bacteriana de outras infeções vaginais. Na vaginose bacteriana as células epiteliais estão completamente cobertas por pequenos bacilos e cocobacilos Gram-variáveis, sendo designadas de “clue cells”. A ausência de células inflamatórias é outra característica de vaginose bacteriana. Normalmente, os lactobacilos estão ausentes ou encontram-se em número reduzido, existindo um predomínio de *Mobiluncus spp.* e/ou *Gardnerella vaginalis* e *Bacteroides spp.*. A vaginose por *G. vaginalis* também é caracterizada por um odor a peixe das secreções vaginais alcalinizadas com KOH a 10%.<sup>6,7</sup>

## 8. Expetoração

Nas infeções do trato respiratório, a capacidade de um microrganismo em originar uma infeção depende não só da sua patogenicidade, mas também da capacidade da pessoa para prevenir a infeção.<sup>6</sup>

A flora normal da nasofaringe e orofaringe ajuda a prevenir a colonização do trato respiratório superior. No entanto, sob certas circunstâncias os microrganismos colonizadores podem originar doença, por exemplo, devido aos danos anteriores resultantes de uma infeção viral, perda de alguma imunidade do hospedeiro ou por dano físico do epitélio respiratório. Alguns dos microrganismos presentes na nasofaringe e orofaringe de pessoas saudáveis e que podem ser possíveis agentes patogénicos, incluem: estreptococos  $\beta$ -

hemolíticos, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Mycoplasma* spp., *H. influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *C. albicans*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium* spp. e *Pseudomonas* spp..<sup>6,13</sup>

Por outro lado, determinados microrganismos são quase sempre considerados como agentes etiológicos da doença, pois possuem fatores de virulência que são expressos em todos os hospedeiro. Como exemplos referem-se o *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *M. tuberculosis*, *Legionella* spp. e *Mycoplasma pneumoniae*.<sup>6</sup>

O exame da expetoração é usado para determinar as causas de pneumonia bacteriana. No entanto, as secreções do trato respiratório inferior são contaminadas com secreções do trato respiratório superior (especialmente saliva) e com a flora comensal da orofaringe durante a colheita. O diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras, pelo que o laboratório deve processar apenas as amostras de boa qualidade.<sup>6,13</sup>

### **8.1. Colheita**

Se possível, deve ser colhida a primeira expetoração da manhã em jejum. Antes da colheita lavar a boca com água. O doente deve ser instruído para colher expetoração por tosse profunda e evitar amostras com saliva ou rinorreia posterior. As amostras são colhidas para um recipiente estéril, seco e de tampa de rosca.<sup>6,13</sup>

Quando solicitada a pesquisa de micobactérias é aconselhado colher 3 amostras em dias consecutivos.<sup>13</sup>

### **8.2. Exame direto e cultural**

No exame direto e cultural deve-se selecionar uma porção purulenta da amostra. Através da coloração de Gram é avaliada a qualidade da expetoração recebida para cultura bacteriológica de rotina. Por observação ao microscópio ótico com objetiva 10 X (cerca de 10 campos) avalia-se a qualidade da amostra tendo em conta a presença de células epiteliais pavimentosas e leucócitos:

- menos de 10 células epiteliais escamosas por campo consiste numa amostra aceitável;
- a presença de 25 ou mais leucócitos polimorfonucleares por campo, em conjunto com poucas células epiteliais escamosas, implica uma excelente amostra.<sup>6,13</sup>

No entanto, este critério não deve ser aplicado em doentes neutropénicos, uma vez que as amostras destes doentes não contêm células brancas. Também não deve ser aplicado na pesquisa de outros agentes específicos, tais como *Mycobacterium* spp., *Legionella* spp.,

*Mycoplasma* spp.. Estes agentes bacterianos causam infecções no trato respiratório inferior e não são detetados pelas culturas bacteriológicas de rotina, pois requerem procedimentos especiais para a deteção.<sup>6,13</sup>

Além da coloração de Gram, as amostras respiratórias podem ser coradas com a coloração Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos ácido-álcool-resistentes. Os esfregaços devem ser cuidadosamente examinados por exploração de pelo menos 300 campos com objetiva de imersão, antes reportar o resultado como negativo. Quando estes bacilos são observados, os resultados devem ser quantificados, de modo a estimar o número de bacilos que são excretados e avaliar o grau de infeciosidade do doente. A visualização destes bacilos deve ser considerada apenas como uma evidência presuntiva de tuberculose, uma vez que a coloração não identifica especificamente *M. tuberculosis*.<sup>6</sup>

Se forem observados bacilos ácido-álcool-resistentes no esfregaço corado por Ziehl-Neelsen o resultado deve ser reportado imediatamente ao clínico.

Depois do exame direto, a amostra é semeada em gelose de chocolate seletiva para *Haemophilus* spp., gelose de sangue e levine. Se o clínico solicitar exame micológico, também é semeado em Sabouraud. Outros meios poderão ser escolhidos em função das conclusões retiradas do exame direto. Por exemplo, na observação de um predomínio de cocos Gram-positivos em cacho, será conveniente semear no meio de manitol salgado.

Na pesquisa cultural das *Mycobacterium* spp., após fluidificação, descontaminação e concentração da amostra é realizado exame direto pelo método de Ziehl-Neelsen e a amostra é semeada em meio de Löwenstein-Jensen.

### **8.3. Interpretação dos resultados**

A valorização das culturas deve ser de acordo com a observação do Gram e informação clínica. Os isolados bacterianos valorizados devem ser reinsolados e identificados.<sup>13</sup>

Nos casos que ocorra crescimento bacteriano polimórfico, sem a ocorrência de colónias de um isolado potencialmente patogénico, não se deve valorizar. Por sua vez, nos casos que ocorra crescimento sugestivo de um isolado bacteriano patogénico, o antibiograma é efetuado de acordo com o microrganismo isolado e identificado.

Na pesquisa de micobactérias, verificando-se um crescimento de colónias no meio, deve ser realizada uma coloração de Ziehl-Neelsen para confirmar que os microrganismos são de facto micobactérias. As características de crescimento e bioquímicas também podem auxiliar na identificação da espécie.<sup>6</sup>

Ao longo do meu estágio observei a presença de bactérias patogênicas nas culturas, como por exemplo, *H. influenza*, *Pseudomonas* spp., *S. pneumoniae* e *Klebsiella* spp..

## 9. Exsudados faríngeos e nasais

A principal etiologia da faringite é viral, no entanto na faringite bacteriana o principal agente etiológico é o *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo A. Assim, o exsudado faríngeo é usado para a sua detecção.<sup>6,13</sup>

A faringite viral ou outras causas de faringite devem ser diferenciadas da originada por *S. pyogenes*, porque a faringite resultante é tratável com antibióticos. O tratamento é de particular importância, uma vez que a infecção com *S. pyogenes* pode conduzir a complicações, tais como febre reumática e glomerulonefrite aguda.<sup>6</sup>

Outras causas de faringite são a *Neisseria gonorrhoeae* e *Corynebacterium diphtheriae*. No entanto, a pesquisa destes agentes deve ser feita exclusivamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do médico.<sup>13</sup>

As culturas de amostras obtidas a partir das narinas frequentemente contêm *S. aureus*. Assim, os exsudados nasais são usados essencialmente para fins epidemiológicos, na detecção de portadores de *Staphylococcus aureus* metilina resistente e, conseqüentemente, para vigilância e controlo de surtos de infecção nosocomial.<sup>6,13</sup>

### 9.1. Colheita

Na colheita dos exsudados faríngeos baixar a língua com espátula e colher a amostra passando vigorosamente a zaragatoa ao nível das amígdalas, porção posterior da faringe e qualquer área inflamada ou ulcerada, evitando tocar na língua e úvula. A amostra não deve ser obtida se existir inflamação da epiglote, pois pode causar espasmos e, conseqüente, obstrução respiratória. Se as amostras não forem processadas dentro de 3 horas após a colheita, é necessário a utilização de meio de transporte.<sup>13</sup>

Nos exsudados nasais insere-se uma zaragatoa estéril em cada narina até encontrar resistência (mais ou menos a nível dos cornetos) e rodar a zaragatoa contra a mucosa nasal. Seguidamente coloca-se em recipiente esterilizado com o meio de transporte adequado.<sup>13</sup>

### 9.2. Exame direto e cultural

O exame direto ajuda pouco no diagnóstico, devido à existência de uma flora mista e da presença de outros estreptococos na orofaringe. Conseqüentemente, a sua interpretação é difícil.<sup>6,13</sup>



No exame cultural para a pesquisa de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos do grupo A utiliza-se a gelose de sangue e se o clínico solicitar a pesquisa do antígeno dos estreptococos do grupo A é utilizado um teste imunocromatográfico.

No despiste de portadores de *S. aureus* na nasofaringe, a amostra é semeada em meio seletivo (manitol salgado).<sup>13</sup>

### 9.3. Interpretação dos resultados

Os estreptococos do grupo A são geralmente  $\beta$ -hemolítico. Se não há um número suficiente de colônias puras para identificação, é necessária uma subcultura exigindo incubação adicional. Ao adicionar um disco de bacitracina diretamente na área de inoculação inicial, a identificação presuntiva de *S. pyogenes* pode ser realizada após incubação, uma vez que todos os estreptococos do grupo A são suscetíveis, como pode ser observado na figura 7. No entanto, utilizar o disco de bacitracina como o único método de identificação de *S. pyogenes* não é recomendado, pois este reduz a sensibilidade e especificidade da cultura na identificação de *S. pyogenes*. A detecção do antígeno também pode ser utilizada na identificação.<sup>6</sup>

Por sua vez, na identificação do *S. aureus*, o meio manitol salgado é vulgarmente utilizado para isolar os estafilococos a partir do material clínico. Nesse meio, o *S. aureus* pode crescer na presença de sal e fermenta o manitol para produzir colônias rodeadas de um halo amarelo. Além disso, para auxiliar na identificação das colônias de estafilococos pode ser efetuado o teste da catalase e o teste da coagulase.<sup>6</sup>

Após a identificação das bactérias nas culturas são realizados os respectivos antibiogramas. Para a detecção de portadores de *S. aureus* metilina resistente, o antibiograma é realizado com penicilina, oxacilina e cefoxitina. Se apresentar resistência aos três antibióticos, então o *S. aureus* tem que ser referido como resistente à metilina.



Figura 7 – Teste de bacitracina com *S. pyogenes*.

## 10. Exsudados auriculares

No ouvido médio não há flora microbiana nos indivíduos saudáveis. A otite média é uma infecção muito frequente em bebês e crianças, cujos agentes patogênicos mais frequentes

são *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *H. influenzae*. Os agentes menos frequentes são *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterobacteriaceae* e anaeróbios.<sup>6,13</sup>

Na otite externa ocorre infecção bacteriana na pele do canal auditivo externo, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* uma causa frequente. A otite externa pode ser aguda ou crónica. Na aguda os agentes patogénicos mais comuns são *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*. Por sua vez, na crónica os principais agentes são a *P. aeruginosa* e anaeróbios.<sup>6,13</sup>

As otomicoses são infeções fúngicas do canal auditivo externo e estão associadas a complicações, algumas vezes envolvendo o ouvido médio. O uso extensivo de antibióticos para o tratamento da otite média e otite externa tem sido associada ao aumento na prevalência de otomicoses. Muitas espécies de fungos podem causar otomicose, mas o *Aspergillus niger* e a *C. albicans* são os agentes etiológicos mais comuns.<sup>19</sup>

### **10.1. Colheita**

As zaragoas são utilizadas para o diagnóstico de infeções bacterianas da pele do canal auditivo externo e de pus com origem no ouvido médio por rutura do tímpano.<sup>13</sup>

### **10.2. Exame direto e cultural**

O exame direto é efetuado através de um esfregaço corado pelo método de Gram.<sup>13</sup>

As amostras são semeadas em gelose de chocolate seletiva para *Haemophilus spp.*, gelose de sangue e Sabouraud. Consoante a observação do exame direto outros meios poderão ser utilizados.

### **10.3. Interpretação dos dados**

Nos casos em que ocorra crescimento sugestivo de um isolado bacteriano ou fúngico patogénico, com base na morfologia do isolado no meio de cultura, são efetuados os testes que auxiliam a sua identificação, como por exemplo, o teste da coagulase, oxidase ou teste do tubo germinativo. Nas infeções por bactérias, após identificação do agente patogénico, é efetuado o respetivo antibiograma.

Ao longo do meu estágio observei alguns microrganismos nas culturas de exsudados auriculares como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger*.

## **11. Exsudados oculares**

A nível do saco conjuntival existe uma flora endógena constituída principalmente por *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Propionibacterium acnes* e *S.*

*aureus*. Numa pequena percentagem de pessoas podem ser encontrados o *H. influenzae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis* e fungos.<sup>6,13</sup>

As infeções oculares podem resultar das estruturas externas do olho, das estruturas internas e do sistema lacrimal. As indicações e técnicas para investigação da infeção são determinadas pela localização, gravidade, rapidez de instalação e pelo conhecimento dos principais agentes implicados.<sup>13</sup>

Uma vez que o laboratório AVELAB é um laboratório de rotina, normalmente são processadas exsudados oculares colhidos com zaragatoa por um técnico de análises. Na tabela 6 estão alguns exemplos de infeções oculares e os principais agentes etiológicos.

**Tabela 6** – Infeções oculares e os principais agentes etiológicos.<sup>6,13</sup>

Infeção	Descrição	Agentes etiológicos
Blefarite	Infeção aguda ou crónica da margem da pálpebra envolvendo a pele e pestanas.	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .
Conjuntivite bacteriana	Inflamação da conjuntiva. A conjuntivite bacteriana representa o tipo mais frequente de infeção ocular.	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>C. trachomatis</i> e <i>Corynebacterium</i> spp.
Dacrioadenite	Infeção aguda das glândulas lacrimais.	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> e <i>S. pneumoniae</i> .
Dacriocistite	Infeção do saco lacrimal, que ocorre habitualmente por obstrução do canal lacrimal.	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>C. albicans</i> e <i>Aspergillus</i> spp.

### 11.1. Colheita

Com uma zaragatoa passar ao longo da conjuntiva tarsal inferior e no fundo de saco do olho. Com outra zaragatoa, repetir o mesmo procedimento para o outro olho.<sup>13</sup>

Na blefarite molhar uma zaragatoa em soro fisiológico esterilizado e passá-la ao longo das margens superior e inferior da pálpebra. Repetir o procedimento com outra zaragatoa no outro olho.<sup>13</sup>

## **11.2. Exame direto e cultural**

O exame direto é efetuado com um esfregaço com a coloração de Gram. Os leucócitos polimorfonucleares predominam na conjuntivite bacteriana.<sup>6,13</sup>

A amostra é semeada em gelose de chocolate e gelose de sangue.

## **11.3. Interpretação dos resultados**

Quando apenas um olho está infetado, pode ser muito útil para o clínico a cultura de ambos os olhos, porque se um agente patogénico cresce nas culturas do olho infetado e do não infetado, o microrganismo pode não ser a causa da infeção. No entanto, se o microrganismo cresce apenas na cultura do olho infetado, este é o agente etiológico mais provável.<sup>6</sup>

Após isolamento e identificação do agente patogénico, é efetuado o respetivo antibiograma.

## **12. Exsudado purulento: ferida e pus de abscesso**

As infeções localizadas que conduzem à formação de exsudados purulentos são resultantes de muitas situações clínicas e muitos são os respetivos microrganismos envolvidos. Diferentes tipos de bactérias, fungos e vírus podem estar envolvidos na infeção da pele. Essas infeções podem resultar de um ou vários agentes patogénicos. Além das infeções que ocorrem principalmente como resultado de uma rotura na superfície da pele, as infeções de feridas podem ocorrer devido a complicações de cirurgias, traumas e picadas.<sup>6,13</sup>

### **12.1. Colheita**

As amostras têm de ser identificadas com os dados demográficos do doente, data e hora da colheita, identificação do produto e local anatómico da colheita.<sup>13</sup>

Em lesões superficiais, limpar a superfície da lesão com água destilada ou soro fisiológico esterilizado e com uma zaragatoa esterilizada esfregar toda a base da lesão. Depois a zaragatoa é colocada no meio de transporte adequado.<sup>13</sup>

A colheita dos exsudados de lesões fechadas deve ser realizada por punção e aspiração com agulha e seringa. Quando se realiza por punção, a pele deve ser desinfetada antes da colheita para evitar contaminações.<sup>13</sup>

## 12.2. Exame direto e cultural

O aspecto macroscópico da amostra é realizado através da avaliação no que respeita ao pus, analisando a sua consistência, cor e quantidade. O exame direto é efetuado através da observação microscópica do esfregaço corado pelo método de Gram e avalia-se a existência de leucócitos e microrganismos presentes.

A amostra é semeada em gelose de sangue, CLED, levine, manitol salgado. Outros meios podem ser adicionados consoante a observação do exame direto.

No material colhido por aspiração, além do processamento anteriormente descrito, a amostra é semeada no caldo Brain-Hearth Infusion. Depois a repicagem do meio líquido para meios sólidos é realizada de acordo com o exame direto e/ou agentes isolados nas culturas iniciais.

## 12.3. Interpretação dos resultados

A identificação e o antibiograma devem ser realizados em estirpes com grande probabilidade de serem agentes patogénicos, independentemente do número presente, como por exemplo, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do Grupo A de Lancefield, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.<sup>13</sup>

Não se valorizam agentes provavelmente contaminantes da pele, como por exemplo, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus viridans*, *Bacillus* spp. e difteróides, exceto quando os microrganismos são isolados em cultura pura e observados no exame direto.<sup>13</sup>

Quando se suspeita de presença de bactérias anaeróbias (por exemplo, visualização de bacilos Gram-positivos no exame direto sem crescimento cultural correspondente), informa-se o clínico, para que prescreva esse pedido e envia-se a amostra para o laboratório de referência para que proceda à identificação do microrganismo.

## 13. Hemoculturas

Nas doenças infecciosas pode ocorrer bacteriemia transitória, intermitente ou persistente. A bacteriemia é frequentemente associada a um aumento considerável nas taxas de morbidade e mortalidade, além de representar uma das mais significativas complicações no processo infeccioso.<sup>13,20</sup>

A hemocultura tem como objetivo pesquisar a presença de bactérias no sangue. O isolamento de um microrganismo patogénico a partir duma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infeção, uma vez que o sangue é um produto biológico estéril. A identificação do agente e o antibiograma auxiliam na orientação da terapia antimicrobiana, cuja aplicação precoce tem demonstrado redução significativa na mortalidade.<sup>7,13,20</sup>

Apesar da maioria das vezes as bacteriemias são causadas por um único microrganismo, em algumas situações, caracterizam-se por etiologia polimicrobiana. A detecção de bacteriemia ou fungemia pode indicar uma falha nas defesas do hospedeiro.<sup>20</sup>

Os fatores que predispõem um doente ao quadro de bacteriemia ou fungemia incluem a idade, doenças de base, medicamentos (por exemplo, quimioterapêuticos) e alguns procedimentos médicos invasivos (por exemplo, cateteres).<sup>20</sup>

### **13.1. Colheita**

A colheita deve ser indicada precocemente ao início dos sintomas de infecção e antes do início da antibioterapia. A colheita do sangue é efetuada por punção venosa das veias periféricas. Quando são realizadas mais do que uma hemocultura, devem efetuar-se as colheitas em diferentes veias periféricas.<sup>7,13,20</sup>

Antes da colheita, desinfetar a rolha de borracha do frasco com álcool. Depois de escolher o melhor local de punção para a colheita de sangue, fazer a antisepsia da pele de acordo com a padronização da instituição. A antisepsia adequada da pele é fundamental e é o fator que determina se uma hemocultura positiva é considerada contaminação ou infecção.<sup>13,20</sup>

Depois de aspirar o sangue, inocular o frasco, não ultrapassando a proporção recomendada pelo fabricante. O número e o intervalo entre as colheitas dependem da situação clínica e da urgência para iniciar a administração de antibióticos. Por episódio infeccioso o número de amostras deve ser no mínimo 2 e no máximo 4.<sup>13,20</sup>

### **13.2. Método manual**

O laboratório AVELAB por vezes recebe hemoculturas de clínicas e utiliza um método manual, através de um meio bifásico, para detetar os microrganismos no sangue.

O meio bifásico é constituído por uma fase líquida e outra sólida, permitindo a observação de crescimento na superfície do ágar. À hemocultura é efetuada um exame macroscópico diário do crescimento microbiano. A subcultura da hemocultura para meio sólido (normalmente para gelose sangue) é efetuada quando esta apresenta turvação, hemólise, formação de gás, formação de película ou colónias visíveis na transição entre o sedimento eritrocitário e o meio de cultura. Nestes casos também deve ser preparada a lâmina para microscopia (Gram).<sup>13,20</sup>

A inspeção visual e a subcultura são fundamentais e o crescimento é incrementado na medida em que é feita a agitação periódica do frasco.<sup>20</sup>

Além da observação diária, após o primeiro e quarto dia de incubação são efetuadas repicagens para gelose de sangue e de chocolate e são observados os esfregaços com a coloração de Gram, com o objetivo de detectar a presença de algum microrganismo.

### 13.3. Interpretação dos resultados

O diagnóstico de septicemia pode ser realizado quando várias hemoculturas são positivas para a mesma bactéria. No entanto, alguns microrganismos quase sempre representam infecções verdadeiras, mesmo quando isolados em somente uma amostra como, por exemplo: *S. aureus*, *E. coli* e outras *Enterobacteriaceae*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Brucella* spp., *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp..<sup>6,7,20</sup>

Um microrganismo pode ser considerado contaminante quando apenas uma hemocultura é positiva ou quando esta é inesperadamente positiva (na ausência de sinais ou sintomas).<sup>7,20</sup>

Alguns microrganismos são frequentemente associados a contaminações como, por exemplo, *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Propionibacterium acnes*. No entanto, nos doentes de alto risco que apresentem mais de uma hemocultura positiva para *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp., pode ter significado clínico. Por outro lado, o *Staphylococcus coagulase* negativo, antes considerado quase sempre como contaminante, pode ser indicativo de infecção em determinadas situações (principalmente associadas a cateter intravascular).<sup>6,20</sup>

No caso de ser identificado o agente patogénico, seguidamente é realizado o antibiograma para auxiliar na escolha terapêutica.

### 14. Pesquisa micológica em cabelos, unhas e pele

As amostras de cabelo, raspado de pele e de unhas são geralmente submetidos à cultura de dermatófitos, os quais são um grupo de fungos que infetam a pele e crescem essencialmente na camada de queratina. Os géneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* são os principais agentes etiológicos das dermatofitoses:

- Género *Trichophyton*: cabelo, pele e unhas;
- Género *Microsporum*: cabelo e pele;
- Género *Epidermophyton*: pele e unhas.<sup>6</sup>

No caso das unhas, caso a lesão ocorra a partir do limbo da unha, provavelmente tratar-se-á de uma onicomicose provocada por dermatófitos. Por sua vez, se a lesão começar na região do leito ungueal, provavelmente é originada por leveduras.<sup>14</sup>

### **14.1. Colheita**

As amostras podem ser obtidas por raspagem da pele ou das unhas com uma lâmina de bisturi. Os pelos infetados são removidos com uma pinça. Depois as amostras devem ser acondicionadas num contentor estéril (por exemplo, placas de Petri).<sup>6,14</sup>

Na colheita das unhas também podem ser utilizados outros utensílios, como tesouras e limas. Nas onicomicoses que são acompanhadas de paroníquia, o pus também deve ser colhido com auxílio de uma zaragatoa.<sup>14</sup>

### **14.2. Exame direto e cultura**

O exame direto micológico permite indicar se o material examinado contém ou não estruturas fúngicas. O KOH facilita a observação microscópica das amostras.<sup>14</sup>

Por sua vez, a cultura permite o isolamento e identificação dos fungos. Utiliza-se o meio de Sabouraud acrescido com antibiótico, com a finalidade de inibir o crescimento bacteriano que possa estar a contaminar a amostra. As culturas deverão ser incubadas durante um mínimo de 21 dias, antes do resultado ser referido como negativo.<sup>6,14</sup>

### **14.3. Interpretação dos resultados**

A identificação é realizada através da avaliação das seguintes características: taxa de crescimento, características morfológicas das colónias e características morfológicas microscópicas.<sup>6</sup>

Apesar da avaliação da taxa de crescimento poder ser útil quando se examina uma cultura, em certos fungos esta é variável, dependendo da quantidade de inóculo presente numa amostra clínica.<sup>6</sup>

O conhecimento do aspeto macroscópico das colónias é de extrema utilidade para a identificação preliminar de uma espécie fúngica. Na observação das características culturais são avaliados os seguintes aspetos: tamanho, bordos, textura, relevo e pigmentação. Contudo, as características morfológicas podem ter valor limitado na identificação, devido a variação natural do crescimento das colónias semeadas em diferentes meios de cultura ou porque os fungos são microrganismos que apresentam um polimorfismo bastante acentuado como, por exemplo, os dermatófitos.<sup>6,14</sup>

A microscopia é uma das mais importantes etapas no diagnóstico micológico, visto que pode ser suficiente para selar o diagnóstico. Na observação microscópica, as estruturas fúngicas presentes são avaliadas em relação a sua morfologia e coloração. Quanto à morfologia, os fungos podem apresentar-se em duas formas primárias distintas: hifas ou



leveduras. Seguidamente dever-se-á caracterizá-la quanto à presença ou ausência de pigmentação de tom acastanhado.<sup>14</sup>

Quando se trata de um fungo filamentosos também caracteriza-se quanto a ausência ou presença de septos. Na identificação final de um fungo filamentosos ou dimórfico são analisadas as estruturas de frutificação e de ornamentação, a fim de se chegar a um diagnóstico preciso. Por sua vez, nas leveduras devemos avaliar a presença ou ausência de hifas e pseudo-hifas.<sup>14</sup>

Assim, durante o período de incubação da cultura, o desenvolvimento e crescimento dos fungos é analisado regularmente. Quando ocorre crescimento de colónias, estas são avaliadas macroscopicamente e microscopicamente. No exame microscópico são observadas as estruturas fúngicas e estas são comparadas com imagens de referência para auxiliar na identificação.

## **IX. Conclusão**

Durante o meu estágio no laboratório AVELAB, além de ter aplicado os meus conhecimentos que adquiri ao longo do Mestrado em Análises Clínicas, tive a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos e ter um contacto direto com a realidade profissional na área das análises clínicas.

Como estagiária tive a possibilidade de participar nas diferentes fases de processamento das amostras. Todas as fases encontram-se ligadas e são essenciais para o bom funcionamento do laboratório.

Nas salas de colheitas, além de aprender algumas técnicas de colheitas, verifiquei a importância da orientação e instrução dos utentes para uma correta obtenção das amostras, uma vez que a qualidade destas irá refletir-se nos resultados. Além disso, também passei pela triagem e pelos diferentes sectores de análises do laboratório, onde nestes últimos são realizadas as diferentes análises e a validação analítica. Na validação dos resultados, a existência de um histórico de análises demonstrou ser uma ferramenta muito importante na interpretação dos resultados.

Apesar do laboratório AVELAB ser um laboratório que realiza principalmente análises de rotina, o estágio demonstrou a importância do papel do laboratório de análises clínicas ao auxiliar na prevenção de doenças, no diagnóstico e no tratamento terapêutico. Além disso, o estágio permitiu-me verificar a importância do trabalho de equipa e da partilha de conhecimentos para o desenvolvimento profissional.

## **X. Referências bibliográficas**

1. HAWKINS, Robert – **Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process.** Ann Lab Med. 32, 1 (2012) 5-16.
2. GOSWAMI, Binita et al. – **Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience.** Clin Chem Lab Med. 48, 1 (2010) 63-66.
3. McPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. – **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.** 22<sup>a</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011. ISBN 978-1-4377-0974-2.
4. Despacho n° 8835/2001. Diário da República, 2.<sup>a</sup> série - N° 98 - 27 de Abril de 2001.
5. KINDT, Thomas J.; GOLDSBY, Richard A.; OSBORNE, Barbara A. – **Kuby Immunology.** 6<sup>a</sup> Ed. New York: W. H. Freeman, 2007. ISBN 13 978-1-4292-0211-4.
6. FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 12<sup>a</sup> Ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. ISBN 13 978-0-323-03065-6.
7. CAQUET, René – **Análises Clínicas – Guia Prático de Medicina.** 1<sup>a</sup> Ed. Lisboa: Climepsi, 2004. ISBN 978-972-796-024-3.
8. BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. – **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.** 6<sup>a</sup> Ed. Missouri: Saunders / Elsevier, 2008. ISBN 978-0-7216-3865-2.
9. HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. – **Essential Haematology.** 6<sup>a</sup> Ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 978-1-4051-9890-5.
10. ASHRAF, M. Javed; COOK, James R.; ROTHBERG, Michael B. – **Clinical utility of folic acid testing for patients with anemia or dementia.** J Gen Intern Med. 23, 6 (2008) 824-826.
11. LEE, Kyunghoon; PARK, Hyun-Doo; KANG, Eun-Suk – **Reduction of the HIV Seroconversion Window Period and False Positive Rate by Using ADVIA Centaur HIV Antigen/Antibody Combo Assay.** Ann Lab Med. 33, 6 (2013) 420-425.
12. KOURILOVITCH, Maria; GALARZA-MALDONO, Claudio; ORTIZ-PRADO, Esteban – **Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis.** J Autoimmun. 48-49 (2014) 26-30.

13. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Programa Nacional de Controlo da Infecção – **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia**. ONSA, PNCI; 2004.

14. SIDRIM, José Júlio Costa; MOREIRA, José Luciano Bezerra – **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. ISBN 85-227-0495-1.

15. BINGHUALI, Lu et al. – **Use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of group B Streptococcus on chromID Strepto B agar**. Int J Infect Dis. 27 (2014) 44-48.

16. MATUSCHEK, E.; BROWN, D. F. J; KAHLMETER, G. – **Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories**. Clin Microbiol Infect. 20,4 (2014) O255-O266.

17. BEHZADI, Payam; BEHZADI, Elham; RANJBAR, Reza – **Urinary tract infections and *Candida albicans***. Cent European J Urol. 68,1 (2015) 96-101.

18. CHIEN, Tzu-I et al. – **Comparison of three automated urinalysis systems—Bayer Clinitek Atlas, Roche Urisys 2400 and Arkray Aution Max for testing urine chemistry and detection of bacteriuria**. Clin Chim Acta. 377, 1-2 (2007) 98-102.

19. MUNGUÍA, Raymundo; DANIEL, Sam J. – **Ototopical antifungals and otomycosis: a review**. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 72,4 (2008) 453-459.

20. ARAUJO, Maria Rita Elmor – **Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados**. J Infect Control. 1,1 (2012) 08-19.

**Anexo – Antimicrobianos utilizados para as diferentes bactérias, de acordo com os protocolos do laboratório AVELAB.**

<b>Bactérias</b>	<b>Antimicrobianos</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	Amoxicilina, cefuroxima, cefotaxima, cefazolina, nitrofurantoína, amoxicilina + ácido clavulânico, sulfametoxazol + trimetoprim, ciprofloxacina e amicacina. Exceções: na <i>Escherichia coli</i> introduzir fosfomicina; nas infeções não urinárias colocar gentamicina em vez de nitrofurantoína; não utilizar quinolonas em doentes com menos de 21 anos.
<i>Salmonella</i> spp.	Ciprofloxacina, sulfametoxazol + trimetoprim, cefoxitina, cefotaxima e ampicilina.
<i>Pseudomonas</i> spp.	Gentamicina, piperacilina + tazobactam, ciprofloxacina, cefepima, aztreoanam, tobramicina, amicacina, imipenem e ceftazidima.
<i>Staphylococcus</i> spp. em infeções urinárias	Amoxicilina + ácido clavulânico, oxacilina, vancomicina, penicilina, sulfametoxazol + trimetoprim, cefoxitina, ciprofloxacina, nitrofurantoína e gentamicina.
<i>Staphylococcus</i> spp. em infeções não urinárias	Sulfametoxazol + trimetoprim, linezolida, amoxicilina + ácido clavulânico, penicilina, gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina, oxacilina, tetraciclina e cefoxitina.
<i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i>	Fosfomicina, ciprofloxacina, amoxicilina, vancomicina, levofloxacina, gentamicina, nitrofurantoína e ampicilina. Exceções: em infeções não urinárias utilizar tetraciclina e linezolida em vez de fosfomicina e nitrofurantoína.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Eritromicina, ciprofloxacina, penicilina, levofloxacina, cefotaxima, azitromicina e ceftriaxona.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Ampicilina, levofloxacina, ofloxacina, penicilina, amoxicilina e cefotaxima.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Ampicilina, sulfametoxazol + trimetoprim, azitromicina, eritromicina e ciprofloxacina.
<i>Haemophilus</i> spp.	Tetraciclina, sulfametoxazol + trimetoprim, cefuroxima, azitromicina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefotaxima, ciprofloxacina, eritromicina e ampicilina.
<i>Acinetobacter</i> spp.	Sulfametoxazol + trimetoprim, imipenem, ceftazidima, ciprofloxacina, tobramicina, piperacilina + tazobactam, amicacina, cefotaxima, gentamicina e aztreoanam.