



Maria Helena Campos Mota

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale e pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Helena Campos Mota

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dr.ª Fátima Maria Madureira Vale e pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

Agradecimentos

À Professora Doutora Olga Maria Cardoso, pela orientação no trabalho, sugestões e paciência.

À Doutora Fátima Vale, pela constante atenção, disponibilidade e motivação.

E ao meu filho Hugo pela ajuda.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABELAS	8
Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract.....	11
I. INTRODUÇÃO.....	13
II. FASE PRÉ ANALÍTICA.....	14
1. Preparação das amostras	15
2. Accelerator P540	16
III. FASE ANALÍTICA	17
1. Métodos instrumentais de análise dos equipamentos	17
1.1. Fotometria.....	17
1.2. Potenciometria.....	17
1.3. Quimioluminescência	18
2. Equipamentos utilizados no laboratório de Bioquímica.....	18
2.1. Architecti8200.....	18
2.2. Arctitecti2000sr.....	19
2.3. Vidas	19
2.4. Image	20
2.5. Urisys 2400.....	20
2.6. UF-1000i.....	20
IV. BIOQUÍMICA	21
1. Parâmetros Analíticos.....	21
1.1. Equilíbrio Eletrolítico e Ácido-Base.....	21
1.2. Gasimetria	22
1.2.1. O ₂	22
1.2.2. pH	23
1.2.3. CO ₂	23
1.2.4. HCO ₃	23

1.3.	Metabolismo dos lípidos e das lipoproteínas	24
1.4.	Metabolismo dos hidratos de carbono e perfil pancreático	27
1.4.1.	Glucose.....	27
1.4.2.	Hemoglobina Glicada (HbA1c).....	27
1.5.	Marcadores da função hepato-biliar	30
1.6.	Marcadores da Função Renal	32
1.7.	Metabolismo do ferro	34
1.8.	Proteínas Séricas	36
1.9.	Marcadores Cardíacos.....	39
1.10.	Marcador Cardíaco - Homocisteína	41
1.11.	Marcadores Tumorais	41
1.12.	Perfil Endócrino.....	43
1.13.	Monitorização de fármacos	45
1.14.	Monitorização de Drogas de Abuso	46
1.15.	Perfil Vírico/Bacteriano	47
1.16.	Metabolismo Mineral Ósseo	48
1.17.	Outros analitos.....	50
1.18.	Indicadores de doenças infecciosas.....	51
V.	MICROBIOLOGIA	53
1.	Equipamentos utilizados, métodos e parâmetros.....	53
1.1.	Equipamentos	53
a)	Sistema VITEK 2 (bioMérieux®)	53
b)	BACT/ALERT® 3D 60 (bioMérieux®)	54
1.2.	Principais atividades técnicas da microbiologia	54
1.3.	Testes de identificação microbiológica	54
1.4.	Meios de cultura	55
1.5.	Morfologia de colónias e características metabólicas	55
1.5.1.	Morfologia de colónias.....	56
1.5.2.	Técnicas manuais que evidenciam características metabólicas e propriedades bioquímicas ..	56
2.	Teste de sensibilidade aos antibióticos – Aparelho VITEK® 2.....	59
2.1.	Metodologia VITEK.....	60
3.	Produtos biológicos – metodologias de análise	61
3.1.	Urina.....	61

3.1.1.	Interpretação e identificação das colónias.....	62
3.2.	Fezes.....	63
3.3.	Expetoração	65
3.3.1.	Pesquisa de BAAR (bacilos ácido-álcool resistentes).....	66
3.4.	Hemoculturas	67
3.5.	Exsudado nasal	68
3.6.	Exsudado vaginal.....	68
3.6.1.	Pesquisa de Streptococcus do grupo B	69
3.7.	Exsudado Orofaríngeo.....	69
3.8.	Exsudado purulento de feridas	70
4.	Exemplo de análises feitas no laboratório.....	71
VI.	CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO.....	72
VII.	CONCLUSÃO.....	73
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

Índice de Figuras

Figura 1 – Workflflow Acceletator P540.....	15
Figura 2 – Accelerator P540	16
Figura 3 – Quimioluminescência	18
Figura 4 – Architeccti8200	18
Figura 5 – Parasitas: <i>Enterobius vermicularis</i> / <i>Giardia lamblia</i> / <i>Entamoeba histolytica</i>	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Ionograma - ARCHITECTCI 8200	21
Tabela 2 – Perfil lipídico - ARCHITEC® ci8200 da Abbott	26
Tabela 3 – PERFIL PANCREÁTICO - ARCHITEC® CI8200 DA ABBOTT	29
Tabela 4 – Perfil hepatobiliar - Architect C8000/Ci8200 da Abbott	31
Tabela 5 – Perfil renal - ARCHITEC® ci8200 da Abbott	33
Tabela 6 – Metabolismo do Ferro - ARCHITEC® ci8200 da Abbott	35
Tabela 7 – Proteínas séricas - Architect C8000/Ci8200 da Abbott	37
Tabela 8 – MARCADORES CARDÍACOS: ARCHITECT CI8200 ABBOTT.....	40
Tabela 9 – Marcadores tumorais - Architect ci8200.....	42
Tabela 10 – PERFIL ENDÓCRINO - ARCHITECT CI8200.....	43
Tabela 11 – Monitorização de fármacos Architect ci8200	45
Tabela 12 – Architect ci8200: Drogas de abuso - Doseamentos realizados na urina	46
Tabela 13 – Perfil Vírico - C8000/Ci8200 da Abbott	47
Tabela 14 – Vírus da Hepatite B: comportamento das diferentes fases de doença face aos marcadores (18).....	47
Tabela 15 – Metabolismo mineral ósseo ARCHITECT C8000/CI8200 da Abott.....	49
Tabela 16 – Outros Analítos	50
Tabela 17 – Indicadores de doenças infecciosas	51

Abreviaturas

- ACAT - Acil colesterol aciltransferase
- ACTH - Hormona adrenocorticotrófica
- AFP - Alfafetoproteína
- AGHBs - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
- ALP - Fosfatase alcalina
- ALT/GPT - Alanina aminotransferase
- AST/GOT - Aspartato aminotransferase
- ATP - Adenosina trifosfato
- AVC - Acidente vascular cerebral
- BNP - Peptídeo Natriurético
- CAMP - Monofosfato cíclico de adenosina
- CGMP - Monofosfato cíclico de guanosina
- CK - Creatina cinase
- CLED - Cystine Lactose Electrolyte Deficient (Cistina lactose deficiente em eletrólitos)
- CMI - Concentração Mínima Inibitória
- COS - Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EAM - Enfarte agudo do miocárdio
- ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay (ensaio de fluorescência enzimática)
- ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
- HCV - Vírus da Hepatite C
- HDL - Lipoproteína de alta densidade
- HIV - Vírus da imunodeficiência adquirida (SIDA)
- HMG-COA - 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A
- HSM - Hospital Sousa Martins
- HTLV - Vírus Linfotrópico da célula T humana
- LACT - Lecitina Colesterol aciltransferase
- LCR - Líquido Cefaloraquidiano
- LDH - Lactato Desidrogenase
- MAC - Mestrado em análises clínicas
- MSA - Gelose Chapman (Manitol saltagar)
- PCT - Procalcitonina
- PSA - Antígeno específico da próstata

PTGO - Prova de tolerância à glicose oral

RNA - Ácido Ribonucleico

SBC - Gelose de sabouraud

T3 /T4 - Triiodotironina/tiroxina

TFG - Taxa de filtração glomerular

TIBC - Total iron binding capacity

TRSF - Transferrina

TSA - Teste de suscetibilidade aos antibióticos

UFC - Unidades formadoras de colónias

ULS Guarda - Unidade Local de Saúde da Guarda

γ GT - γ glutamil transferase

Resumo

O presente trabalho é composto por duas partes fundamentais que refletem os assuntos que escolhi abordar no meu estágio curricular do MAC (Mestrado em Análises Clínicas): Bioquímica e Microbiologia.

Assim, são abordados ensaios e metodologias executados no serviço de Patologia Clínica da ULS (Unidade Local de Saúde) da Guarda. Neste serviço são processados um grande número de parâmetros distribuídos pelas diferentes áreas, mas que não poderei abordar todos uma vez que o número de páginas é limitado. Serão referidos apenas os que são determinados com maior frequência na rotina laboratorial e que fazem parte do âmbito deste relatório. A componente analítica subjacente aos estudos quantitativos realizados é aqui devidamente descrita em termos das metodologias e fundamentos das técnicas utilizadas na determinação desses parâmetros.

Palavras-chaves: Bioquímica Clínica, Microbiologia, Análises Clínicas, Parâmetros Bioquímicos, Microrganismos.

Abstract

The present report is composed by two fundamental parts which reflect the topics that I have chosen to approach in my Clinical Analysis Master's Degree curricular internship: Biochemistry and Microbiology.

Thus, trials and methodologies executed in the analysis laboratory of the Clinic Pathology of Guarda's ULS (Local Health Unit) are approached.

Despite the great quantity of parameters determined in ULS Guarda's laboratory, I shall not be able to develop on all of them, since that is not the main objective of this report. The analytic component underlying the quantitative studies carried out is properly described in terms of the methodologies and fundamentals of the techniques used in determining those parameters, as well as theoretical substantiation fundamental to the interpretation of results.

Keywords: Clinical Biochemistry, Microbiology, Clinical Analysis, Biochemical Parameters, Microorganisms.

I. INTRODUÇÃO

O estágio em Análises Clínicas é parte integrante do plano de estudos do MAC e possui como objetivos gerais: promover a integração no seio profissional e o contato com outros profissionais de saúde; aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos num contexto real de trabalho; promover a capacidade de trabalho em equipa e, igualmente, a autonomia; desenvolver a capacidade de organização e de execução das atividades diárias na rotina laboratorial; e promover o contato com os doentes, aplicando princípios éticos e deontológicos.

O estágio decorreu no Hospital da Guarda, no serviço de Patologia clínica, sob a orientação do seu responsável a Dr.^a Fátima Vale.

O laboratório de Patologia Clínica deste Hospital, cumpre os requisitos de qualidade, executa controlo de qualidade interno e participa em programas de avaliação externa de qualidade, que avaliam o desempenho de trabalhadores, equipamentos, técnicas, tendo como finalidade assegurar resultados fiáveis com relevância clínica e uma resposta de qualidade para ajudar numa boa decisão de diagnóstico clínico e terapêutica para com o doente.

Para além de tudo isto não podemos esquecer o empenho e motivação liderado pela sua responsável, que soube inculcar esse mesmo propósito a toda a equipa e que resulta não só na qualidade dos serviços prestados, mas também na sua vocação pedagógica de ensinar e preparar outros profissionais para o futuro.

II. FASE PRÉ ANALÍTICA

A fase pré analítica representa um dos pontos mais importantes e críticos nas análises clínicas, para a obtenção de resultados fiáveis. Assim, a informação cedida ao utente sobre o modo como se deverá apresentar, os cuidados que o técnico deve ter na colheita, assim como o acondicionamento e transporte da amostra, são procedimentos de grande relevância tendo em vista a obtenção das melhores condições técnicas para que as amostras, sejam representativas da situação clínica do utente e possam ser processadas.

Dado o número elevado de amostras que diariamente chega ao laboratório, todo o processo está informatizado para que os erros sejam minimizados.

Tudo começa com a correta identificação das amostras na fase de colheita e o seu processamento informático para que se inicie o pedido da análise e esta siga todo o seu percurso sem extravio ou enganos. A cada pedido de análise, é atribuído um número a que corresponde tantas etiquetas com códigos de barras quantas as amostras necessárias para a satisfação desse mesmo pedido.

O procedimento de colheita/receção, encontra-se documentado no manual de colheitas e instruções no qual são definidos as metodologias e procedimentos da colheita das amostras que o laboratório analisa, assim como os critérios de aceitação/rejeição das amostras. Nos critérios de rejeição temos a considerar por exemplo, amostras não identificadas ou mal identificadas, com quantidade insuficiente, vertidas, coaguladas, hemolisadas, colhidas em tubos/materiais inadequados, com anticoagulante incorreto, em condições inadequadas de transporte e armazenamento tais como temperatura e tempo e ainda, contaminadas por erros de colheita ou problemas na centrifugação quando esta é necessário.

É de salientar que dentro do hospital existe manual de colheitas e instruções em todos os serviços e valências onde se fazem as colheitas e que serve de apoio a todos os profissionais responsáveis pelo processo, sob indicação do laboratório.

As amostras devidamente identificadas são direcionadas para o laboratório, onde são processadas. São utilizados autoanalisadores que, como sistemas integrados, identificam as amostras, realizam as análises pedidas e disponibilizam os resultados para posterior validação pelo especialista responsável, ficando os resultados imediatamente disponíveis para o clínico por via informática.

De salientar também a necessidade de o prescritor dar informação clínica relevante que pode ser útil na validação da análise.

1. Preparação das amostras

A separação e preparação das amostras para análise estão incluídas na fase pré-analítica. Assim, quando as amostras chegam ao laboratório são triadas e quando necessário centrifugadas. Em seguida, as amostras são colocadas no Accelerator P540, equipamento inicial que serve para automaticamente, separar, quer em alíquotas que serão levadas até aos diferentes autoanalisadores, quer para armazenamento e arquivamento automático.

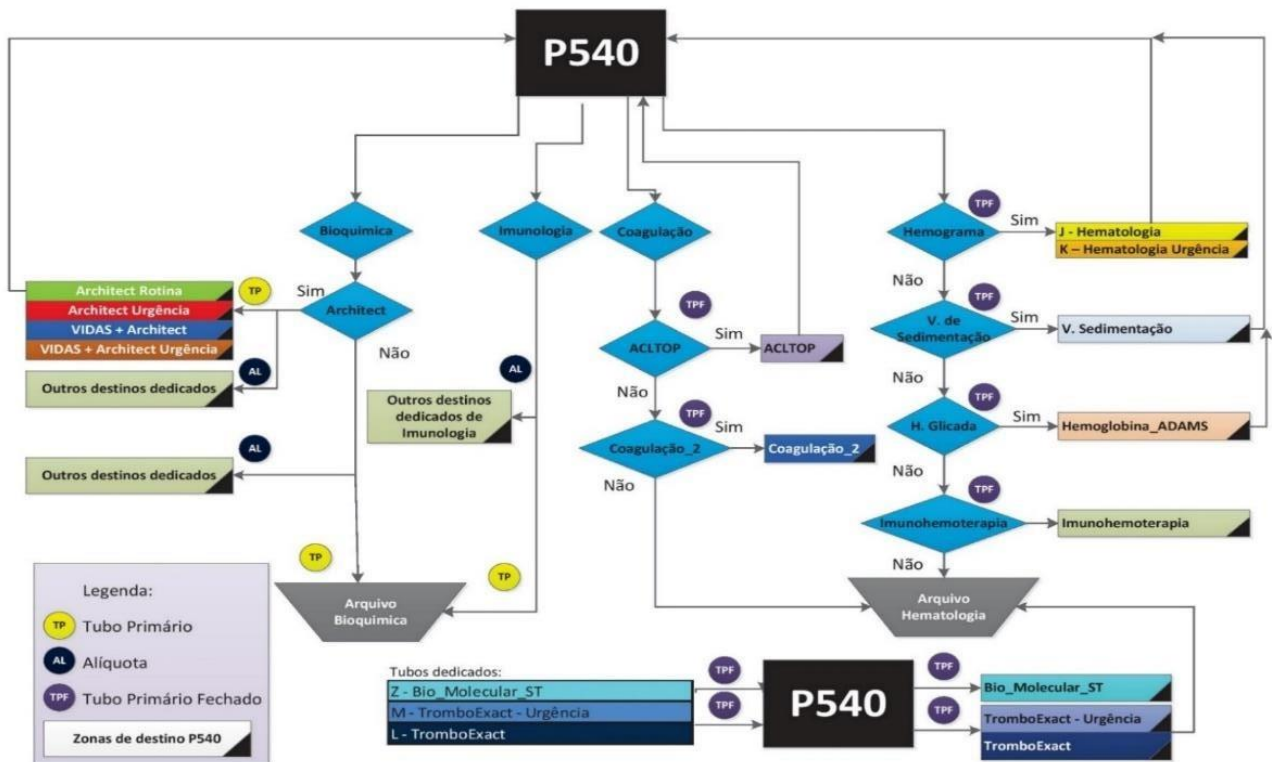


FIGURA 1 – WORKFLOW ACCELETATOR P540

O workflow acima esquematiza a distribuição e circuito das amostras no Accelerator P540, ferramenta essencial na seleção e distribuição das amostras, arquivo e alíquotagem. Para garantir que as amostras tenham a qualidade necessária, é imprescindível implementar metodologias rigorosas, que reduzam o erro, uma vez que a maioria acontece por falta de padronização dos processos. Os procedimentos escritos e padronizados minimizam esses erros, tendo a automatização um papel importante neste processo.

2. Accelerator P540

O Accelerator P540 permite automatizar as tarefas pré e pós analíticas, com as funções de descapsulamento, avaliação da quantidade e distribuição das amostras, realização de alíquotas e identificação destas por impressão de novos códigos de barras, e arquivamento pós análise. É de salientar que as alíquotas processadas são arquivadas e congeladas a temperaturas de aproximadamente de -50°C , mantendo a integridade da amostra até realização do total doseamento do analito em causa. (1) A figura 2 representa o aparelho em causa.



FIGURA 2 — ACCELERATOR P540

III. FASE ANALÍTICA

O laboratório do serviço de Patologia clínica da ULS da Guarda dispõe de um vasto número de equipamentos automáticos, que permitem trabalhar um número elevado de amostras que chegam dos vários serviços do hospital e dos centros de saúde a que dá apoio.

A fase analítica da bioquímica no laboratório é a mais automatizada, o que diminui o risco de acidentes e reduz a taxa de erro.

Após a triagem das amostras, estas são direcionadas para os diferentes autoanalisadores para o seu processamento. Para a bioquímica são utilizados, dois equipamentos Architectci8200, um dedicado a análises de rotina e outro a análises urgentes e o Architecti2000sr onde são processados parâmetros imunoquímicos como por exemplo homocisteína, Ag Hbe e Ag HBs ou HTLV entre outros.

Estes equipamentos utilizam simultaneamente diferentes metodologias como métodos instrumentais de análise nesta área, a potenciometria, a fotometria e a quimioluminescência.

1. Métodos instrumentais de análise dos equipamentos

1.1. Fotometria

É uma técnica que utiliza a luz como forma de energia caracterizada pelos seus diferentes comprimentos de onda. O espectrofotómetro faz passar um feixe de luz monocromática através de uma solução (resultante de uma reação enzimática, colorimétrica ou turbidimétrica) medindo assim a quantidade de luz absorvida (absorvância) por essa solução no comprimento de onda estabelecido. Esta técnica relaciona a quantidade de luz absorvida e a fração transmitida e detetada pelo foto-detetor, com a concentração de substância a analisar, permitindo a sua identificação e quantificação. (2)

1.2. Potenciometria

A potenciometria mede a tensão ou o potencial gerado entre dois elétrodos numa célula eletroquímica quando da passagem de corrente. A célula é composta por um eletrodo de referência cujo potencial é constante, conhecido e insensível à composição a analisar e um eletrodo indicador com resposta rápida e reprodutível, mas seletivo para o ião a analisar. Ambos os elétrodos estão ligados a um voltímetro, que compara o potencial medido com o potencial do eletrodo de referência. O potencial resultante corresponde à atividade do ião e está diretamente relacionado com a sua concentração na solução analisada. (3)

1.3. Quimioluminescência

É um tipo de luminescência em que o evento de excitação é causado por uma reação química. O evento físico da emissão de luz ocorre num único estado de excitação em que a luz é emitida quando o elétron regressa de um nível energético superior ao seu estado basal de energia. A excitação é causada por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico por um agente oxidante. A reação ocorre na presença de um catalisador, como as enzimas, iões metálicos ou outros complexos metálicos.

A quimioluminescência é um método usado num vasto leque de imunoenaios automatizados competitivos e não competitivos em sandwich, que utilizam anticorpos ou antígenos ligados a um marcador luminescente. Os marcadores quimioluminescentes, emitem luz quando combinados com um reagente *trigger* (gatilho), sendo os derivados da acridina os mais usuais. Estes emitem grandes quantidades de luz sendo mais fácil a sua medição, tornando o método mais sensível. A figura 3 exemplifica o método em causa.

O equipamento Architect® usa uma versão patenteada da quimioluminescência associada ao imunoenasão, o ChemiFlex®. É um ensaio não competitivo em sandwich, em que o sinal medido é diretamente proporcional à concentração de analito na amostra.



FIGURA 3 – QUIMIOLUMINESCÊNCIA

2. Equipamentos utilizados no laboratório de Bioquímica

2.1. Architecti8200

O autoanalisador Architecti8200 é um sistema aberto e completamente automatizado que permite o processamento contínuo das amostras de uma forma rápida, sensível e preciso utilizando métodos fotométricos, potenciométricos e quimioluminescência.

O Architecti8200 tem capacidade para realizar 25 parâmetros imunológicos e cerca de 68 químicos. Assim



FIGURA 4 – ARCHITECCTI8200

são analisados parâmetros como: Ionograma, Perfil hepático, renal, pancreático, lipídico e endócrino, Metabolismo do ferro, Proteínas séricas, Marcadores cardíacos e tumorais, Monitorização de fármacos e Drogas de abuso, Microbiologia serológica e antigénica entre outros. A figura 4 representa um modelo do aparelho em causa.

O módulo de processamento, realiza todas as atividades desde a aspiração até à obtenção do resultado. Pode realizar cerca de 800 ensaios fotométricos por hora.

O equipamento faz a calibração dos ensaios, criando uma curva de calibração de uma concentração conhecida (calibradores) de um analito. O sistema representa graficamente os valores obtidos, tendo como referência os calibradores. Assim torna-se necessário e obrigatório calibrar o sistema sempre que se usa um novo lote de reagentes, se instala um novo ensaio ou a curva de calibração tenha expirado. Valores de controlo que não se encontrem dentro das especificações, procedimentos realizados para a manutenção ou substituição de componentes ou registo de algum erro do sistema é de todo recomendável calibrar os ensaios.(4)

2.2. Architecti2000sr

No Architecti2000sr realizam-se imunoensaios, através de micropartículas, por quimioluminescência. O processamento das amostras é rápido, e a sua finalidade é detetar qualitativa e quantitativamente antigénios e/ou anticorpos IgM e IgG. Destina-se assim à realização de testes imunológicos e víricos, em amostras de soro e plasma. Para determinar a concentração do analito em estudo, induz-se uma reação química, adicionando reagentes para haver emissão de luz. Esta fornece informações sobre os imunocomplexos formados, e a quantidade de luz emitida corresponde à concentração do analito em estudo.(5) Neste equipamento são realizados o perfil endócrino e doenças infecciosas.

2.3. Vidas

VIDAS é um imunoanalisador automatizado, cujo princípio utilizado é o ELFA. Associa o método imunoenzimático sandwich (ELISA), com a deteção final em fluorescência (ELFA).

São utilizados pequenos cones para a realização dos testes, e que têm um papel importante para a realização dos ensaios. Estes cones de utilização única, são sensibilizados e marcados com anticorpos específicos para o antigénio que se pretende estudar na altura do seu fabrico. Servem assim como fase sólida e como suporte para a pipetagem. Os reagentes de reação imunológica estão prontos a serem utilizados e encontram-se já repartidos pela

barrete, a qual é também introduzida no equipamento. Esta, possui vários poços, sendo que o primeiro poço apresenta uma parte perfurada, de modo a permitir a introdução da amostra e o último poço permite a leitura por fluorometria. (6)

Os parâmetros analisados são a Vitamina D, Procalcitonina, Toxoplasmose e Citamegalovirus, Rubéola, testes alternativos para testes específicos de serologia e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

2.4. Image

Equipamento que por nefelometria e turbidimetria realiza ensaios baseados em reações de imunoprecipitação e imunofluorescência, em que parte da luz que é incidida é dispersada, consoante a concentração do analíto. Neste equipamento são realizados ensaios para a Alfa-1-antitripsina, Ceruloplasmina, Apolipoproteína A e B, Lipoproteína A, Haptoglobina, Imunoglobina A, G e M, Cadeias Kappa e Lamda, complemento Clq, C3 e C4 e outras Imunoglobinas.

2.5. Urisys 2400

Equipamento que por fotometria e reflectância realiza a sumária de urina: Cor, ph, densidade, bilirrubina, urobilinogénio, corpos cetónicos, glucose, proteínas, nitritos, leucócitos e eritrócitos.

2.6. UF-1000i

Equipamento que por Citometria de fluxo fluorescente, faz a deteção de características físicas/químicas das células permitindo a sua contagem. Nele é feito a análise do sedimento urinário e deteção de células epiteliais escamosas e do epitélio renal, leucócitos, eritrócitos, bactérias e leveduras⁰, espermatozoides, cilindros e cristais.

IV. BIOQUÍMICA

1. Parâmetros Analíticos

1.1. Equilíbrio Eletrolítico e Ácido-Base

Os eletrólitos são responsáveis pela manutenção da pressão osmótica e pelo equilíbrio eletrolítico, desempenhando um papel importante nas funções metabólicas. O ionograma representa a quantificação do sódio, potássio e cloro, iões que são absorvidos pelo trato gastrointestinal e excretados pelos rins. (7)

TABELA 1 – IONOGRAMA – ARCHITECTCI 8200

Parâmetro	Descrição	Valor aumentado (↑) valor baixo(↓)
Sódio	Principal catião do fluido extracelular desempenha um papel importante na manutenção da sua osmolaridade, do potencial elétrico nas células musculares e no controlo da permeabilidade das membranas celulares. Os níveis sanguíneos são controlados pela excreção ou reabsorção deste ião pelo rim.	↑ Desidratação, Síndrome de Cushing, consumo elevado de sal sem a respetiva compensação em água, desidratação grave e diabetes. ↓ Uso excessivo de diuréticos, por perda gastrointestinal (vômito prolongado ou diarreia), diminuição na ingestão de sódio na dieta, acidose metabólica, doença de Addison e doença renal. A determinação da concentração de Na^+ é feita por um eletrodo seletivo e os valores de referência variam entre 136 e 147 mEq/L.
Potássio	Principal catião intracelular, sendo o seu valor dentro das células muito superior ao encontrado fora delas. Tem como funções a manutenção do potencial de repouso celular da membrana e da pressão osmótica. É essencial nos processos elétricos dos tecidos musculares, especialmente no do miocárdio.	↑ Na doença renal e na lesão cardíaca. Provoca confusão mental, paralisia, debilidade. ↓ No vômito e diarreia prolongados, uso de diuréticos e em alguns tumores. Provoca debilidade muscular, irritabilidade, paralisia, batimento cardíaco acelerado e, eventualmente paragem cardíaca. A monitorização do equilíbrio do potássio é fundamental, em especial em doentes com problemas no ritmo cardíaco ou em insuficiência renal aguda, em doentes sujeitos a tratamentos com diuréticos, digoxina ou diálise. A determinação da concentração de K^+ é feita por um eletrodo seletivo e os valores de referência variam entre 3,5 e 5,1 mEq/L.
Cloro	Principal anião do fluido extracelular, tem um papel importante na manutenção do equilíbrio hídrico e pressão osmótica, constituindo o contra-ião do sódio.	↑ Na desidratação, na acidose metabólica associada à diarreia prolongada e à perda de Na^+ , em doenças dos túbulos renais; ↓ No Vômito prolongado com perda de HCl, em acidose metabólica, na doença de Addison e doença renal. A determinação da concentração de Cl^- é feita por um eletrodo seletivo e os valores de referência variam entre 98 e 106 mEq/L.

Determinação laboratorial do ionograma (Na⁺, K⁺ e Cl⁻):

Amostras - Soro, Plasma e Urina. A hemólise é um interferente de grande importância sobretudo no caso do K⁺.

Método - Potenciometria (ISE indireto).

Cálculo e Expressão de Resultados: Quando é solicitada a excreção urinária destes iões, o resultado é convertido de mmol/L / d24h de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Excreção de 24 h (mmol/24h)} = (V \times C)$$

em que V = Volume de urina de 24 h (mL), e C = concentração do analíto (mmol/L).

1.2. Gasimetria

Em equilíbrio, a pressão parcial de um gás é a mesma nos eritrócitos, no plasma, e no sangue total. A gasimetria é um teste que efetua a medição do pH de gases sanguíneos, a pressão parcial de oxigénio (p O₂) e a pressão parcial de dióxido de carbono (p CO₂), permitindo identificar alterações no equilíbrio ácido-base, o que é indispensável para a monitorização terapêutica de doentes que recebam oxigénio por ventilação mecânica, bem como avaliar o grau de insuficiência respiratória aguda, distinguindo hipoxemia com ou sem hipercapnia.

Na hipoxemia sem hipercapnia, é desencadeada uma hiperventilação, reflexo que permite que o CO₂, muito difundível, seja eliminado. Observa-se então hipocapnia e alcalose respiratória por hiperventilação alveolar.

Na hipoxemia com hipercapnia, a hipercapnia é acompanhada, muito frequentemente, de acidose respiratória mais ou menos compensada por um aumento do bicarbonato plasmático, consoante a insuficiência respiratória é mais ou menos recente.

1.2.1. O₂

A gasimetria avalia o estado de oxigenação através de:

- 1) **Saturação do oxigénio** - Mede a proporção em que o oxigénio está ligado à hemoglobina. Indica a capacidade dos pulmões de transmitir oxigénio ao sangue. Melhor indicador da disponibilidade de O₂ para as células, que deve ser superior a 96%.
- 2) **Pressão parcial de oxigénio** - refere-se ao oxigénio dissolvido no plasma. No sangue arterial é um indicativo da capacidade dos pulmões de enriquecer o sangue com oxigénio. Reflete assim a disponibilidade total de oxigénio para os tecidos. É um parâmetro essencial para calcular o grau de saturação do oxigénio de um paciente, tendo em conta o grau de hipoxémia (carência de O₂ no sangue arterial).

1.2.2. pH

O valor de pH extracelular tem uma estreita correlação com o intracelular e é por isso particularmente importante para a deteção de perturbações ácido-base assentantes em verdadeiras causas patológicas, renais, respiratórias ou gastrointestinais. O pH representa o logaritmo inverso do número de iões de hidrogénio livres numa solução e o seu valor no sangue é indicado pela relação do ião bicarbonato (HCO_3^-) face ao respetivo ácido CO_2 . O pH normal do sangue arterial varia entre 7,35 e 7,45. Para valores de pH abaixo do limite inferior estamos perante uma acidose e acima do limite superior perante uma alcalose.

1.2.3. CO_2

O dióxido de carbono é produzido durante o metabolismo normal da célula e é libertado no fluxo sanguíneo, onde é transportado para os rins e pulmões para ser excretado. O CO_2 é transportado pelo sangue sob a forma de ião bicarbonato (HCO_3^-), CO_2 dissolvido e ácido carbónico (H_2CO_3), e tem um papel importante na manutenção do pH do sangue. Em conjunto, o pH e a $p\text{CO}_2$ constituem uma ferramenta de diagnóstico segura na avaliação da função respiratória. Um aumento do valor da $p\text{CO}_2$ e uma diminuição do pH indicam acidose respiratória, ou seja, condição em que o CO_2 é retido pelos pulmões. Uma diminuição do valor da $p\text{CO}_2$ e um aumento do pH indicam alcalose respiratória, ou seja, a condição em que os pulmões expiram demasiado CO_2 para a quantidade produzida.

A $p\text{CO}_2$ depende principalmente do funcionamento dos pulmões e da eliminação de CO_2 . As alterações da $p\text{CO}_2$ permitem inferir uma alteração do estado respiratório.

Valores de referência normais: 35 - 46 mmHg

- Valores mais elevados (**hipercapnia**) - sinal de troca gasosa deficitária nos pulmões.
- Valores mais baixos (**hipocapnia**) - sinal de uma respiração demasiado rápida ou profunda; ou compensação de uma acidose metabólica.

1.2.4. HCO_3^-

Os rins são o principal órgão de controlo do ião bicarbonato. A sua concentração tem relevância clínica na determinação dos componentes não respiratórios, ou seja, renais e metabólicos, em caso de perturbações ácido-base. As alterações da concentração de HCO_3^- , conjuntamente com os valores de pH, ajudam a identificar se existe uma acidose ou alcalose de origem metabólica. É um parâmetro calculado automaticamente pelo aparelho.

1.3. Metabolismo dos lípidos e das lipoproteínas

A necessidade de doseamento dos lípidos baseia-se no risco de doença cardiovascular que estes representam. No entanto, alguns dos parâmetros do perfil de risco lipídico podem estar aumentados noutras doenças como a diabetes, o hipotireoidismo ou doença renal.

O colesterol constitui o elemento precursor das vias metabólicas de síntese da vitamina D, dos ácidos biliares e hormonas esteroides, sendo ainda o componente estruturante das membranas celulares. Após ser absorvido pelas células da mucosa intestinal, juntamente com os triglicéridos, fosfolípidos e várias apolipoproteínas específicas, forma os quilomicrons. Embora uma parte do colesterol do organismo provenha da ingestão alimentar, a maior parte é sintetizada pelo fígado a partir de moléculas mais simples. Uma vez sintetizado, o colesterol é transportado na forma de lipoproteínas. No compartimento vascular e na periferia, o colesterol é esterificado com ácidos gordos pelas enzimas lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) no plasma, e acil colesterol aciltransferase (ACAT) dentro das células. Os ésteres do colesterol constituem cerca de 70% do colesterol total no plasma(8).

O HDL pertence às lipoproteínas e a sua formação ocorre no fígado e no intestino, exercendo um papel importante na remoção do colesterol dos tecidos, reduzindo assim, a quantidade de colesterol que aí se fixou. Exerce também um papel fundamental no retorno do colesterol da periferia para o fígado e remoção sob a forma de ácidos biliares, ou seja, o transporte reverso do colesterol. O HDL arrasta o colesterol não-esterificado e a LCAT do plasma transforma este colesterol livre nos seus ésteres.

As LDL (Lipoproteína de baixa densidade) são β -lipoproteínas responsáveis pelo transporte da maior parte do colesterol no plasma. Têm menor conteúdo em triglicéridos e contêm um tipo específico de porção proteica, a apo-B100. O seu catabolismo ocorre no fígado e nos tecidos periféricos. As LDL são a principal fonte de colesterol para a síntese de hormonas esteroides e interagem com os seus recetores na membrana celular que são depois orientados sob a forma de vesículas endocíticas. Estas vesículas fundem-se com os lisossomas intracelulares onde a LDL é hidrolisada por enzimas. A apo-B transforma-se em aminoácidos, e o colesterol esterificado torna-se colesterol livre, sendo libertado no citoplasma. Esta situação é responsável por três respostas reguladoras que controlam a homeostasia do colesterol: a modulação da atividade da enzima responsável pela síntese endógena de colesterol a HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase), o controlo da atividade da ACAT a fim de esterificar o excesso de colesterol para armazenamento intracelular em éster de colesterol, e expressão do número de recetores de

LDL na membrana citoplasmática. O aumento da captação de LDL pelos macrófagos nas células musculares lisas provoca a criação de depósitos de colesterol nas paredes arteriais promovendo a aterosclerose. Os níveis elevados de LDL constituem um fator a favor do desenvolvimento de doença cardiovascular(8).

Após a ingestão dos alimentos, os triglicéridos são emulsionados no estômago e no intestino. No duodeno, a emulsão lipídica reage com a lipase pancreática e os sais biliares, onde os triglicéridos são hidrolisados a glicerol e ácidos gordos. Estes vão ser agregados em micelas pela ação dos sais biliares. Nas células intestinais, os ácidos gordos de cadeia longa combinam-se com o glicerofosfato para formar de novo triglicéridos, dando origem aos quilomicrons, constituídos por triglicéridos, colesterol e apolipoproteínas. Os ácidos gordos de cadeia média e curta entram diretamente para a veia porta sem passar pela célula intestinal. No fígado, os triglicéridos são sintetizados e excretados como VLDL. No tecido adiposo, os triglicéridos armazenados estão constantemente a sofrer hidrólise e reesterificação. O resultado destes dois processos define a disponibilidade dos ácidos gordos livres no tecido adiposo que, por sua vez, vai determinar o seu teor no sangue(8).

TABELA 2 – PERFIL LIPÍDICO- ARCHITEC® CI8200 DA ABBOTT

Analito	Descrição	Importância clínica	Metodologia
Colesterol Total	Lípido sintetizado pelo fígado usado para a produção de hormonas esteroides e constituintes das membranas celulares. O seu doseamento é importante para o diagnóstico e classificação das lipoproteinémias. Utilizado para estabelecer o risco de coronariopatias, e na avaliação das hiperlipoproteinémias. A sua quantificação é utilizada no diagnóstico da função hepática, biliar, e funcionamento da tiroide. O <i>stress</i> , a idade, o equilíbrio hormonal e a gravidez afetam os níveis de colesterol.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Risco de oclusão da artéria coronária; ↑ Risco de aterosclerose; ↑ Hipertensão arterial; ↑ Risco de enfarte do miocárdio; ↑ Risco cardiovascular generalizado; ↓ Desnutrição; ↓ Disfunções hepáticas. 	Reação colorimétrica (Colesterol esterase /colesterol oxidase/peroxidase), com formação de composto corado, a quinoneimina, que absorve a 510 nm
HDL (High Density Lipoprotein)	Produzido no fígado e em menor quantidade no intestino, tem a função de captar o colesterol dos tecidos periféricos e transportá-lo até ao fígado para excreção, através do processo de transporte reverso.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Prevenção de desenvolvimento de doença coronária (cardioprotetor); ↓ Risco de aterosclerose; ↓ Risco de AVC; ↓ Risco de enfarte do miocárdio. 	Método direto baseado na ação inibidora de anticorpo anti-β-lipoproteínas (bloqueador dos quilomicrons, LDL e VLDL) e formação de complexo corado que absorve a 593nm.
LDL (Low Density Lipoprotein)	O colesterol transportado por esta lipoproteína pode depositar-se nos tecidos periféricos, contribuindo para a formação de placas, ateromatosas nas paredes dos vasos gerando aterosclerose e maior risco de doenças cardiovasculares. O seu valor é: colesterol total - (HDL + triglicéridos)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Risco de aterosclerose; ↑ Risco de AVC; ↑ Risco de enfarte do miocárdio. 	Detergente seletivo líquido, medido
Triglicéridos	Absorvidos através da dieta, ou produzidos por via endógena, a partir de hidratos de carbono e ácidos gordos. Identificam o risco desenvolver coronopatia, sendo que é determinada em doentes com suspeita de distúrbios do metabolismo das gorduras, pois estas são armazenadas e transportadas pelos triglicéridos.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Hipotiroidismo; ↑ Obesidade; ↑ Insuficiência renal; ↑ Alimentação rica em hidratos de carbono; ↓ Hipertiroidismo. 	Ensaio colorimétrico com formação de um cromogéneo que absorve a 510nm, e que envolve a Glicerol fosfato oxidase

Determinação laboratorial dos Lípidos e lipoproteínas:

Amostras: Soro ou Plasma colhidos em jejum (preferencialmente de 8-12h).

Método: Espectrofotometria.

1.4. Metabolismo dos hidratos de carbono e perfil pancreático

1.4.1. Glucose

A glucose é a principal fonte de energia para os tecidos e é regulada por diferentes hormonas, como a insulina, o cortisol e o glucagon. Alterações no metabolismo da glucose correspondem, maioritariamente, a hiperglicemia, ou, em menor extensão, a hipoglicemia.

O doseamento da sua concentração no sangue e na urina (glicosúria) é útil no diagnóstico de patologias metabólicas como a *Diabetes mellitus*. Pelo contrário, a sua diminuição pode ser um dado importante no diagnóstico das meningites bacterianas no liquor. Nas meningites virais, os níveis variam de normais a discretamente baixos. Níveis elevados de glucose no LCR não possuem significado clínico, refletindo aumento da glicemia sistémica.

Determinação laboratorial da glucose:

Soro ou Plasma - colhido em jejum, pós-prandial ou a tempos determinados após sobrecarga de glucose.

Método - Espectrofotometria.

Equipamento - ARCHITEC® ci8200 da Abbott.

1.4.2. Hemoglobina Glicada (HbA1c)

A hemoglobina glicada (HbA1c), corresponde a uma molécula de hemoglobina ligada covalentemente a uma molécula de glucose. Isto depende da quantidade de glucose livre em circulação no sangue no tempo e semivida dos eritrócitos. Forma-se irreversivelmente durante a vida média do eritrócito. A sua determinação é utilizada como auxiliar no diagnóstico e monitorização da glicémia em indivíduos com *diabetes mellitus*.

Os indivíduos aos quais foi diagnosticada *diabetes mellitus* apresentam, valores altos em percentagem de HbA1c. A diabetes não controlada pode originar complicações graves como hiperglicemia e cetose, levando a outras complicações a longo prazo tais como doença cardiovascular, nefropatia e neuropatia. Os doentes apresentam uma resistência à insulina por alteração do número de recetores (diabetes tipo A), anomalia dos recetores (diabetes tipo B) e disfunção das células β , provocando secreção inadequada de insulina (9).

O diagnóstico de diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral (fonte - DGS-2/2011):

- 1) Glicémia de jejum ≥ 126 mg/dl (ou $\geq 7,0$ mmol/L);
- 2) Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/L);

- 3) Glicémia ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/L) às 2 horas, na prova de tolerância à glucose oral (PTGO) com 75 g de glucose;
- 4) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

Quanto à Diabetes Gestacional o diagnóstico envolve duas fases temporais distintas: glicemia em jejum na primeira consulta de vigilância pré-natal e PTGO às 24-28 semanas de gestação.

- 1) Valor de glicemia plasmática em jejum <92 mg/dl (5,1 mmol/L) implica a realização entre as 24-28 semanas de gestação, de PTGO com sobrecarga de 75 g de glucose;
- 2) Valor da glicemia plasmática em jejum ≥ 92 mg/dl (5,1 mmol/L) e <126 mg/dl /7,0 mmol/L) faz diagnóstico de diabetes gestacional, não sendo necessária a realização de PTGO com 75 g de glucose às 24-28 semanas de gestação;
- 3) Valor de glicemia plasmática em jejum ≥ 126 mg/dl (7 mmol/L) ou um valor de glicemia plasmática ocasional >200 mg/dl (11,1 mmol/L) (este valor deve ser confirmado numa segunda ocasião, em dia diferente, com outra glicemia ocasional ou uma glicemia em jejum) indicia a existência de uma diabetes provavelmente anterior à gravidez, diagnosticada pela primeira vez na gestação em curso.

A amostra de sangue total é tratada com um agente de desnaturação da hemoglobina para lisar eritrócitos e degradar a hemoglobina pela pepsina, formando um hemolisado. A concentração de hemoglobina total é determinada por espectrofotometria, enquanto que a concentração de HbA1c é determinada por imunoturbidimetria.

TABELA 3 – PERFIL PANCREÁTICO - ARCHITEC® CI8200 DA ABBOTT

Analito	Descrição	Importância clínica	Metodologia
Amílase	Enzima produzida pelo fígado, pâncreas, glândulas salivares e trompas de Falópio, transforma amido em açúcar. Utilizada no diagnóstico e monitorização da pancreatite aguda e tumores pancreáticos, situações em que os seus valores séricos estão elevados. Associada também a síndromes abdominais dolorosas sem lesão pancreática pelo que a amílase, apesar de sensível, não é específica de doença pancreática.	↑ Pancreatite aguda; ↑ Amiloidose; ↑ Doenças das glândulas salivares; ↑ Inflamação pulmonar.	Substrato de CNPG3(2-chloro-p-nitrophenyl- α -D-maltotriósido)
Lípase	Enzima secretada pelo pâncreas no duodeno. Responsável pelo processamento dos triglicéridos. O seu doseamento é importante para o diagnóstico de pancreatites, tumores e outras patologias do pâncreas acompanhadas de cálculos biliares, onde a enzima se encontra elevada.	↑ Pancreatite aguda; ↑ Cancro do pâncreas; ↑ Obstrução do ducto pancreático.	Corante de quinona
Glicose	Fonte de energia das células, obtida na alimentação. Em excesso, leva à produção de insulina através do pâncreas. Se esta não for secretada, a glicose fica em níveis elevados podendo levar à <i>Diabetes mellitus</i> . Utilizada no diagnóstico e monitorização de distúrbios relacionados com o metabolismo dos hidratos de carbono.	↑ <i>Diabetes mellitus</i> ; ↑ Obesidade; ↑ Hepatopatia grave; ↓ Insulinoma; ↓ Tumores pancreáticos; ↓ Insuficiências supra-renal	Hexoquinase

Determinação laboratorial da amílase e da lípase:

Amostras: Soro, Plasma (amostras colhidas em jejum) e Urina.

Método: Espectrofotometria.

1.5. Marcadores da função hepatobiliar

O fígado tem a seu cargo numerosas e importantes funções. Cabe a este órgão produzir e armazenar aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e minerais. Para além disso sintetiza algumas proteínas plasmáticas, fatores de coagulação e proteínas de transporte. É o local por excelência de desintoxicação de compostos exógenos, tais como fármacos e toxinas, catabolismo de várias hormonas, ajudando a regular o seu nível plasmático.

Contudo existem outras funções importantes no fígado tais como a conjugação da bilirrubina com o ácido glucorónico e a síntese de ácidos biliares que regulam o metabolismo do colesterol e permitem a melhor absorção das gorduras provenientes da dieta. (10)

Assim sendo qualquer lesão hepática que cause necrose celular a nível do hepatócito, induz a libertação de enzimas, cuja avaliação no soro permite determinar a extensão do dano hepático e também diferenciar a patologia hepatocelular da obstrutiva. Desta forma consideramos que concentrações séricas elevadas das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), refletem situações de dano hepatocelular. Por outro lado, níveis elevados de fosfatase alcalina (ALP) e de γ -glutamyltransferase (GGT) podem significar colestase biliar. (11)

Após o final do seu ciclo de circulação sanguínea, os eritrócitos são decompostos no sistema reticuloendotelial, principalmente do baço. Assim o grupo heme resultante depois da remoção do ferro é transformado em bilirrubina, que representa cerca de 80% da bilirrubina produzida diariamente. A 20% da bilirrubina restante surge do catabolismo dos glóbulos vermelhos imaturos da medula óssea, da decomposição da mioglobina e citocromos. Esta é transportada para o fígado pela albumina, denominada de bilirrubina indireta ou não conjugada. Uma vez no fígado é conjugada com o ácido glucorónico e passa a bilirrubina conjugada ou direta, mais solúvel, podendo assim ser excretada pelo sistema biliar para o intestino.

TABELA 4 – PERFIL HEPATOBILIAR- ARCHITECT C8000/Ci8200 DA ABBOTT

Alanina Aminotransferase (ALT)	Encontrada predominantemente no fígado. É considerada indicador mais específico no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas e para monitorizar a evolução do tratamento da hepatite e da cirrose ativa pós-necrótica. Não sendo específica do fígado pode ser encontrada em tecidos musculo-esquelético, rim e coração. A sua semi-vida é de cerca de 47 horas mantendo-se as suas concentrações séricas mais que a AST.	↑ Hepatites; ↑ Cirrose hepática; ↑ Tumores hepáticos; ↑ Enfarte agudo do miocárdio.	NADH (sem P-5'-P)
Aspartato Aminotransferase (AST)	Constituída por duas isoenzimas, uma citoplasmática e outra mitocondrial, está concentrada em tecidos altamente metabólicos, como o músculo cardíaco, os hepatócitos, células hematopoiéticas, rim, cérebro e o tecido musculo-esquelético. Utilizado na determinação do progresso e prognóstico de pacientes com enfarte do miocárdio, e diagnóstico e monitorização de doenças hepáticas. Semi-vida de cerca de 17 horas diminuindo rapidamente os seus níveis séricos.	↑ Embolia pulmonar; ↑ Enfarte de miocárdio; ↑ Cirrose alcoólica.	NADH (sem P-5'-P)
Lactato Desidrogenase (LDH)	Enzima intracelular utilizada para confirmar o diagnóstico de lesão ou doença que afete o coração, o fígado, os eritrócitos, os rins, o músculo-esquelético, o cérebro e os pulmões. É portanto, pouco específico quando isolado.	↑ Anemia Hemolítica; ↑ Anemia Megaloblástica; ↑ Cirrose hepática; ↑ Doenças cardio-respiratórias; ↑ Distrofia muscular; ↑ Neoplasias.	Reação inversa Lactato a piruvato
Amonia	Substância tóxica para o organismo que resulta do catabolismo dos aminoácidos, sendo convertida pelo ciclo da ureia neste seu metabolito menos tóxico. A hiperamoniemia pode ser primária quando ocorrem defeitos genéticos ou congénitos na formação de enzimas do ciclo da ureia ou secundária no caso de lesão hepática, normalmente grave.	↑ Hepatites ↑ Neoplasias hepáticas ↑ Cirrose hepática	
Gama-Glutamil-Transferase (γ-GT)	É produzida pelo fígado, pâncreas e rins, aparecendo na corrente sanguínea após lesão destes órgãos. Pode indicar lesões orgânicas, presença de substâncias químicas tóxicas, abuso de álcool e doenças do pâncreas. O aumento da GGT é identificado mais precocemente e é mais acentuado relativamente a outras enzimas hepáticas em casos de obstrução hepatobiliar.	↑ Alcoolismo crónico; ↑ Drogas; ↑ Doenças hepáticas; ↑ Hepatocarcinoma; ↑ Cancro do pâncreas.	Substrato de L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida
Fosfatase Alcalina T (ALP)	Está presente na maioria dos tecidos do organismo essencialmente nas membranas celulares. Encontra-se em grandes quantidades no fígado, no epitélio do trato biliar e osso e é utilizada na deteção e monitorização de doenças hepáticas, biliares e ósseas. Pouco específica do fígado aparece aumentada noutras doenças.	↑ Aumento do metabolismo ósseo; ↑ Hipertiroidismo; ↑ Linfoma de Hodgkin; ↑ Doenças hepáticas; ↓ Hipotiroidismo; ↓ Desnutrição; ↓ Doença celíaca.	Para-nitrofenil fosfato
Bilirrubina Total	Formada por degradação dos eritrócitos no baço, fígado e medula óssea. É utilizada na avaliação da função hepática, na anemia hemolítica e na icterícia do recém-nascido.	Hiperbilirrubinémia: ↑ Doenças hemolíticas;	Diazo
Bilirrubina Direta	Bilirrubina ligada ao ácido glucorónico é posteriormente excretada para a bília de forma a ser eliminada pelo intestino delgado. Teste da capacidade do fígado para conjugar a bilirrubina e excretá-la.	↑ Doenças hepáticas; ↑ Obstrução hepática	Diazo

Amostras: Plasma.

Método: Espectrofotometria.

1.6. Marcadores da Função Renal

O rim é o órgão de maior importância nos mecanismos de homeostase do organismo, devido às suas funções de filtração, reabsorção e excreção de variados metabolitos. Assim, a diminuição da função renal acarreta, em geral, aumento da morbidade, pela acumulação de toxinas e outros produtos resultantes do catabolismo, como a creatinina e ureia, e também por perda de substâncias como a albumina. A determinação dos parâmetros bioquímicos é de grande importância no diagnóstico das alterações da função renal. Exemplo disso é a creatinina, produto final da eliminação da creatina, proteína que resulta do catabolismo muscular e que é eliminada por filtração glomerular, resultando a redução da função renal no aumento dos níveis séricos de creatinina. Desta forma, a quantificação da creatinina sérica é um indicador importante para o diagnóstico e monitorização da doença renal aguda ou crônica. A filtração renal é avaliada pela TFG (taxa de filtração glomerular) e é expressa em volume de sangue plasmático, do qual é removida uma substância específica por minuto.

A ureia, por outro lado, é o produto que resulta do catabolismo das proteínas, sendo utilizada, também, para o diagnóstico de patologias renais e metabólicas. Metabolizada no fígado e excretada pelo rim, o seu doseamento concomitantemente com a creatinina tem interesse para avaliação da função renal e da hiperurémia na monitorização de doentes em diálise. A hiperurémia pode ser de origem pré-renal (descompensação cardíaca, depleção hídrica, aumento do catabolismo de proteínas), renal (glomerulonefrite, nefrite crônica, rim policístico, nefrosclerose, nefrose tubular) e pós-renal (obstruções do trato urinário). (12)

O rim tem também uma função importante na produção da eritropoietina, que regula a produção de eritrócitos, da renina reguladora do balanço eletrolítico de sódio pela estimulação da aldosterona e produção ainda de calcitriol que estimula a absorção de cálcio e a calcificação óssea.

TABELA 5 – PERFIL RENAL- ARCHITEC® CI8200 DA ABBOTT

Analito	Descrição	Importância clínica	Metodologia
Ácido úrico	<p>Produto final do metabolismo das purinas (adenina e guanina) durante a síntese e degradação de RNA e de DNA. Utilizado na avaliação da gota ou de cálculos urinários recorrentes e defeitos tubulares renais.</p> <p>Excretado pelos rins, pode acumular-se em caso de disfunção renal. A hiperuricemia pode levar à formação de depósitos de cristais de urato nos rins.</p>	<p>↑ Insuficiência renal; ↑ Cálculos renais; ↑ Gota; ↑ Envenenamento por chumbo; ↑ Diabetes, hipotireoidismo e aterosclerose; ↑ Anemia Hemolítica; ↓ Defeitos tubulares renal; ↓ Défice em folatos; ↓ Doença de Wilson.</p>	Uricase
Creatinina	<p>É o produto final do metabolismo da creatina e encontra-se essencialmente no tecido músculo-esquelético. É livremente filtrada e excretada no túbulo proximal do rim e só uma pequena parte é reabsorvida sendo utilizado na avaliação da função renal.</p>	<p>↑ Insuficiência renal crônica ou aguda; ↑ toxicidade por fármacos; ↑ Diabetes não controlada; ↑ Insuficiência cardíaca congestiva; ↑ Exercício físico intenso; ↓ Redução da massa muscular; ↓ Distrofia muscular.</p>	Picrato alcalino cinético
Ureia	<p>Composto azotado intermediário do metabolismo das proteínas e dos ácidos nucleicos. Formada no fígado, maioritariamente excretado pela urina, utilizada no diagnóstico e tratamento de doenças renais e metabólicas, pois traduz o desempenho da filtração renal.</p>	<p>↑ Glomerulonefrite; ↑ Pielonefrite; ↑ Insuficiência renal aguda ou crônica; ↑ Dieta rica em proteínas; ↑ Desidratação; ↓ Insuficiência hepática aguda; ↓ Dieta pobre em proteínas</p>	Urease
Microalbuminúria	<p>Proteína mais abundante no plasma, a sua concentração é afetada pelo funcionamento hepático, pelo equilíbrio hidroeletrolítico e pela perda de proteínas. Nas doenças renais as lesões glomerulares e tubulares causam aumento da filtração das proteínas plasmáticas e redução da reabsorção das mesmas.</p>	<p>A concentração de albumina sérica, juntamente com a presença de proteínas na urina são indicadores de alteração na função renal.</p>	Nefelometria e turbidimetria
Cistatina C	<p>A cistatina C é produzida por todas as células nucleadas, numa taxa constante e é praticamente toda eliminada da circulação através da filtração glomerular.</p> <p>Marcador precoce de dano renal.</p>	<p>A sua concentração sérica é independente da massa muscular e do sexo no intervalo de 1 a 50 anos, por isso, surge como um marcador mais sensível para avaliação da função renal.</p>	Turbidimetria

Amostras: Soro, Plasma e Urina.

Método: Espectrofotometria Visível.

1.7. Metabolismo do ferro

O ferro é o elemento metálico de transição mais abundante no organismo, sendo proveniente da dieta e da reciclagem dos eritrócitos. Circula no sangue ligado à transferrina, uma β -globulina sintetizada no fígado, que atua como proteína de transporte. Na medula óssea, os precursores eritróides utilizam parte do ferro disponível, sendo o restante armazenado sob a forma de ferritina e de hemossiderina nas células do reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea. Assim é essencial à síntese da hemoglobina e mioglobina, para além de estar presente nas várias reações bioquímicas do metabolismo, sendo crucial para a homeostase celular. É importante no transporte de oxigénio, na síntese de DNA e em cofatores fundamentais em enzimas da cadeia respiratória e mitocondrial.

O estudo do metabolismo do ferro é feito pela determinação da capacidade total de ligação do ferro (TIBC), das concentrações do ferro, da ferritina, da transferrina, do ácido fólico e da vitamina B12.

A TIBC é uma medida que permite fazer um diagnóstico diferencial dos diferentes tipos de anemia, pois reflete a concentração máxima de ferro que as proteínas séricas, principalmente a transferrina, podem ligar nos seus locais de ligação ao ferro, quando estão saturadas. Aumenta na deficiência de ferro e diminui nas desordens inflamatórias crónicas.

O índice de saturação da transferrina é outro dos parâmetros importante no estudo do metabolismo do ferro e que reflete a capacidade de transporte de ferro feito pela transferrina, sendo, este muito utilizado para identificar casos de anemia por deficiência em ferro quando este está baixo, ou quando está alto a principal suspeita é de hemacromatose.

A anemia ferropénica tem por base a má absorção de ferro (doença gastrointestinal), hemorragia prolongada, hematúria e gravidez. Por outro lado, o excesso de ferro armazenado sob a forma de ferritina e hemossiderina tende a depositar-se quando atinge a saturação, em diferentes órgãos, de que resultam patologias progressivamente graves e de efeitos cumulativos como a Hemocromatose. Esta é de algum modo secundária a outras como: Anemia Megaloblástica, Anemia Hemolítica crónica, e a sobrecarga por transfusões sanguíneas frequentes e hemodiálise prolongada.(13)

TABELA 6 – METABOLISMO DO FERRO- ARCHITEC® CI8200 DA ABBOTT

Analito	Descrição	Importância Clínica	Metodologia
Capacidade Total de ligação do Ferro (TIBC)	Medida que reflete a concentração máxima de ferro que as proteínas séricas, principalmente a transferrina, podem ligar nos seus locais de ligação ao ferro, quando estão saturadas.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Deficiência de ferro; ↓ Desordens inflamatórias crônicas; ↓ Doenças malignas; ↓ Hemocromatose 	Ferrosene
Ferro (Fe)	Constituinte da hemoglobina, está relacionado com o transporte do oxigênio até aos tecidos, através dos eritrócitos. A sua determinação é útil no diagnóstico e na monitorização de anemias ferropénicas e em situações de hemocromatose, devendo ser acompanhada pelo estudo da ferritina e transferrina.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Anemias sideroblástica e hemolítica; ↑ Hemocromatose; ↑ Doença hepática ↑ Talassémia; ↓ Perda crónica de sangue; ↓ Má Absorção de ferro, ou dieta pobre em ferro. ↓ Na anemia ferropénica 	Ferrosene
Ferritina	Macromolécula de armazenamento do ferro intracelular no organismo, protegendo-o dos efeitos tóxicos. É o mais sensível e fiável marcador da anemia, sendo utilizada no diagnóstico e monitorização da anemia ferropénica e sideroblástica, bem como na hemocromatose. Meio auxiliar para avaliar a atividade da doença maligna. Pr	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Excesso de ferro por múltiplas transfusões; ↑ Hemocromatose; ↑ Anorexia; ↑ Doenças inflamatórias crônicas; ↑ Linfomas e leucemias entre outras doenças malignas; ↓ Anemia ferropénica e sideroblástica; ↓ Doença celíaca. 	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA)
Transferrina (TRSF)	Principal proteína transportadora de ferro no soro.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Anemia Ferropénica; ↑ Gravidez; ↑ Uso de contraceptivos orais; ↓ Síndrome nefrótico e patologia hepática crónica; ↓ Hemocromatose. 	Imunoturbidimétrica
Ácido fólico	Ambos utilizados no diagnóstico e monitorização de anemias megaloblásticas, sendo que o seu papel está relacionado com a síntese, reparação e funcionamento do RNA, do DNA e de proteínas mitocondriais. Necessária à maturação dos eritrócitos.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Anemias Megaloblásticas; ↑ Diminuição e défice na síntese de DNA; ↓ Doença celíaca ou a falta de fator intrínseco 	Ensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) de ligação às proteínas
Vitamina B12		<ul style="list-style-type: none"> ↓ Com uso de medicamentos como metotrexato, fenitoína, fenobarbital e ácido valpróico entre outros e o alcoolismo. 	Ensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) de fator intrínseco

Determinação laboratorial do ferro:

Amostras: Soro. Amostra colhida em jejum e preferencialmente pela manhã, pois sofre variação circadiana.

Método: Espectrofotometria Visível - Ferene S + Ferro complexo corado.

Determinação laboratorial da transferrina:

Amostras: Soro.

Método: Imunoturbidimetria.

Determinação laboratorial da ferritina, folatos e vitamina B12:

Amostras: Soro.

Método: Quimioluminescência (CMIA).

1.8. Proteínas Séricas

As proteínas são parte integrante das células, fluídos e órgãos, estando envolvidas em numerosos processos orgânicos. As proteínas plasmáticas, de transporte e de defesa, que exercem as suas funções na circulação e no fluido extracelular, são as que têm maior interesse em bioquímica. A maioria é sintetizada no fígado, sendo as imunoglobulinas a exceção.

O valor das proteínas totais séricas pode variar por alterações das proteínas específicas ou do volume de água no plasma. Assim, em caso de doença, quer o nível plasmático de proteínas totais, quer o rácio das frações individuais, podem estar significativamente alterados. Alterações nas proporções de proteínas plasmáticas podem ocorrer em uma ou várias frações das proteínas e, frequentemente, sem alterações na totalidade das proteínas. Estas alterações a nível das proteínas totais apresenta uma correlação clínica variada e que justificam a sua determinação.(14)

TABELA 7 – PROTEÍNAS SÉRICAS- ARCHITECT C8000/Ci8200 DA ABBOTT

Analito	Descrição	Importância Clínica	Metodologia
Albumina	Principal proteína do soro. Sintetizada no fígado, está envolvida no transporte de várias substâncias e contribui para a manutenção da pressão oncótica. Utilizada na monitorização de doenças inflamatórias crônicas e renais.	↑ Desidratação e hipovolémia ↓ Doenças hepáticas e renais; ↓ Aumento do catabolismo e desnutrição; ↓ Queimaduras graves; ↓ Infecções e situações de malignidade.	Verde de Bromocresol
Proteínas Totais	Sintetizadas no fígado, fazem parte a albumina e as globulinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ . A determinação destas é utilizada em diversos distúrbios hepáticos, renais, metabólicos, nutricionais e relacionados com a medula óssea.	Hiperproteínemia: ↑ Desidratação grave; Macroglobulinémia de Waldenström; ↑ Mieloma múltiplo e cirrose hepática; ↑ Inflamações. Hipoproteínemia: ↓ Gravidez; ↓ Hepatopatias; ↓ Insuficiência cardíaca; ↓ Glomerulonefrite e síndrome nefrótica; ↓ Hemorragia prolongada; ↓ Má absorção de proteínas ou queimaduras graves; ↓ Síndromes de retenção de sal; ↓ Síndrome de Kwashiorkor (carência aguda de proteínas).	Biureto
Proteína C-Reativa (PCR)	Proteína de fase aguda precoce, muito sensível, mas pouco específica. Marcador utilizado também para monitorizar a resposta terapêutica farmacológica ou cirúrgica.	↑ Resposta de fase aguda em distúrbios inflamatórios, lesão tecidual e infecções; ↑ Stress.	Turbidimétrica/ Imunoturbidimétrica

Amostras: Soro e Plasma.

Método: Imunoturbidimetria.

Outras proteínas de grande interesse clínico, podem ser determinadas, sendo que, no nosso laboratório, estas determinações são feitas por turbidimetria e nefelometria.

A procalcitonina (PCT) é uma proteína produzida na tiroide, e em menor extensão nos tecidos neuroendócrinos de outros órgãos como no fígado, no pulmão e no pâncreas. Existe no sangue em níveis baixos, contudo, a sua produção pode ser estimulada por citocinas inflamatórias e endotoxinas bacterianas, aumentando assim a sua concentração sanguínea.

Desta forma a PCT é um marcador de fase aguda para detetar infeções, sobretudo de origem bacteriana, uma vez que nas infeções de outra origem, os seus valores de concentração não se alteram significativamente. É um ótimo marcador precoce de sépsis, pois possui uma rápida cinética. A PCT tem funções biológicas, como mediador da resposta inflamatória.

A alfa 1-antitripsina é uma proteína circulante do sangue, produzida principalmente a nível hepático, cuja função é a inibição de proteases, principalmente a elastase. Esta protege os tecidos de serem danificados pela enzima elastase, presente nos neutrófilos, monócitos e eosinófilos, quando estas entram em ação aquando da resposta á inflamação. As suas pequenas dimensões permitem-lhe que se difunda nos fluidos corporais facilmente.

A ceruloplasmina é uma glicoproteína, produzida pelo fígado, responsável pelo transporte de 80 a 95% do cobre plasmático. Proteína de fase aguda e a sua principal utilização clínica é no diagnóstico diferencial de várias doenças hepáticas e da doença de Wilson, a qual é acompanhada pela diminuição dos níveis séricos de ceruloplasmina.

A lipoproteína A é uma lipoproteína funcional e estruturalmente única, considerada como um fator de risco independente para a doença coronária, cerebrovascular, vascular periférica e tromboembolismo venoso. A sua função fisiológica não é ainda bem conhecida, no entanto, parece possuir uma função importante no sistema de coagulação, pois apresenta grande afinidade com o plasminogénio e com o fator ativador do plasminogénio tecidual. Compete com o plasminogénio pelas zonas de ligação, levando a uma fibrinólise reduzida, e estimula também a secreção do inibidor do ativador do plasminogénio, levando a tromboembolismos. A haptoglobina é uma proteína de transporte e de fase aguda sintetizada no fígado que se liga à hemoglobina, quando esta é libertada por hemólise, formando um complexo muito estável com ela. É importante a nível do controlo de processos inflamatórios locais, assim como para avaliar a severidade da patologia hemolítica. Além disso, o complexo haptoglobina-hemoglobina age como uma peroxidase, hidrolisando os peróxidos libertados durante a fagocitose impedindo a peroxidação lipídica. Tem também um papel bacteriostático ao impedir que as bactérias utilizem o ferro da hemoglobina.

As imunoglobulinas A, G e M são glicoproteínas produzidas pelos plasmócitos em resposta a um antígeno e funcionam como anticorpos. Encontram-se presentes a nível da membrana dos linfócitos B, conferindo assim especificidade antigénica a estas células, que ao circularem pelo sangue neutralizam antígenos ou marcam-nos para serem eliminados.

A imunoglobulina A (IgA) constitui 10 a 15% do total das imunoglobulinas séricas. É a classe de imunoglobulinas mais abundante a nível das secreções externas, como o leite materno,

saliva, lágrimas e secreções gastrointestinais e brônquicas e apresenta uma função importante na proteção do trato respiratório e do trato genito-urinário contra infecções. A imunoglobulina G (IgG) é a principal imunoglobulina presente no sangue, sendo produzida em grandes quantidades durante a resposta imunitária, desempenhando um papel importante na neutralização de toxinas bacterianas e na fagocitose de microrganismos.

A imunoglobulina M (IgM) representa 5 a 10% das imunoglobulinas séricas e é a primeira classe de imunoglobulinas a ser produzida pelos recém-nascidos. A sua concentração nos fluidos intracelulares é baixa devido às suas grandes dimensões. Participa na resposta imunitária primária e esta característica permite perceber se a infecção é aguda ou crônica.

As imunoglobulinas são compostas por quatro cadeias peptídicas, duas cadeias leves (Kappa e Lambda) e duas cadeias pesadas. A região amino-terminal das cadeias leves e pesadas variam de anticorpo para anticorpo, conferindo deste modo diferentes especificidades entre anticorpos, pois é nesta região que tem lugar a ligação antigénica. A produção de cadeias leves Kappa é normalmente duas vezes maior do que a produção de cadeias leves do tipo Lambda. Estes valores de cadeias Kappa e Lambda são importantes para o diagnóstico e monitorização de algumas patologias, como hepatopatias e mieloma múltiplo. A principal aplicação da quantificação das cadeias leves reside na identificação do carácter monoclonal ou policlonal da proliferação de plasmócitos ou de células linfóides.

As proteínas do Complemento C1q, C3, C4 e CH50 são um grupo de proteínas séricas que identificam e destroem os agentes infecciosos por lise, por opsonização ou por recrutamento de células fagocíticas que promovem inflamação. Desta forma, são úteis no diagnóstico de patologias imunológicas, processos inflamatórios e necróticos, tais como: inflamação crónica não infecciosa, doenças sistémicas, distúrbios necróticos, glomerulonefrite, pneumonia, meningite bacteriana e septicémia.

1.9. Marcadores Cardíacos

O enfarte do miocárdio pode ocorrer pela diminuição do fluxo sanguíneo resultante do estreitamento das artérias coronárias ou isquemia. A falta de oxigénio resultante pode causar danos/necrose nas células cardíacas e libertação de proteínas no sangue, designadas marcadores cardíacos, importantes no diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio (EAM).

Os biomarcadores cardíacos são por si, um elemento fundamental para o diagnóstico das síndromes coronárias agudas, uma vez que, a avaliação clínica é frequentemente limitada por sintomas atípicos e, por vezes, o eletrocardiograma inicial não permite a avaliação por si só. O conhecimento do padrão de subida destas substâncias no sangue periférico e dos seus

valores de referência é fundamental em contexto clínico. Para além da sua utilidade no diagnóstico ou na exclusão de enfarte agudo do miocárdio, os biomarcadores cardíacos fornecem informação prognóstica e permitem uma melhor orientação terapêutica. (15)

TABELA 8 – MARCADORES CARDÍACOS: ARCHITECT CI8200 ABBOTT

Analito	Descrição	Importância Clínica	Metodologia
Creatina-Quinase (CK)	Quantificação de CK utilizada para o diagnóstico e tratamento de doenças associadas ao músculo esquelético, coração, sistema nervoso central e tireóide.		NAC (N-Acetil-L-Cisteína)
CK-MB	Isoenzima da CK, presente no tecido do miocárdio. O aparecimento da CK-MB no soro, na ausência de traumatismo muscular grave, pode indicar danos cardíacos e, por conseguinte, enfarte do miocárdio.	↑ Enfarte agudo do miocárdio, com diminuição após 12 a 48 horas do episódio; ↑ Miocardite. Em conjunto com a Troponina I é o teste mais sensível e específico para avaliar o dano no tecido cardíaco.	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) - determinação quantitativa da isoenzima MB da CK.
BNP	O Peptídeo natriurético, é sintetizado e libertado na corrente sanguínea devido a sobrecarga de volume ventricular ou patologias causadoras de dilatação ventricular, controlando a homeostasia dos fluidos e eletrólitos. Níveis plasmáticos de BNP fornecem informações úteis no diagnóstico e tratamento da disfunção do ventrículo esquerdo e insuficiência cardíaca, para avaliar a gravidade da insuficiência cardíaca.	↑ Disfunção cardíaca ↑ Em doentes com insuficiência cardíaca indica progressão da doença e aumento da morbilidade e mortalidade.	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA)
Mioglobina	Proteína de ligação do oxigénio, encontrada no músculo cardíaco e no músculo esquelético. A sua determinação fornece um índice de lesão do miocárdio, sendo utilizado para avaliação inicial de pacientes com suspeita de enfarte agudo do miocárdio.	↑ Dano muscular; ↑ Falência renal; ↑ Miocardite; ↑ Cirurgia cardíaca; ↑ Exercício físico intenso.	
Troponina I	Proteína encontrada maioritariamente nas células do músculo cardíaco. Liberação e elevação na circulação após lesão do miocárdio, entre 4 a 6 horas, após destruição da membrana dos miócitos. Específica de lesão cardíaca.	↑ Enfarte agudo do miocárdio, permanece elevada até 10 dias após o enfarte, ↑ Miocardite; ↑ Angina pectoris.	

Método: Quimioluminescência

Amostras: Soro ou Plasma

1.10. Marcador Cardíaco - Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido produzido pela desmetilação intracelular da metionina que circula no plasma. A hiperhomocisteinémia constitui um fator de risco de trombose venosa e arterial que pode ser exacerbado pela deficiência de cofatores do metabolismo da metionina, como a vitamina B6, a vitamina B12 e o ácido fólico. A hiperhomocisteinémia induz disfunção endotelial, com perda de propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas dependentes do endotélio, e proliferação do músculo liso vascular, ambos processos-chave nos modelos atuais de aterogénese e trombose. A determinação da homocisteína é realizada através de um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) para a determinação quantitativa de L-homocisteína total em soro ou plasma humanos. (15)

1.11. Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes em tumores, sangue e outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alteração de concentração se relaciona com a origem e crescimento de células neoplásicas. Bioquimicamente, estão presentes proteínas ligadas a hidratos de carbono ou lípidos, que podem atuar como antigénios, hormonas, enzimas e proteínas séricas. A sua presença é um indicador importante para o rastreio e diagnóstico de tumores, monitorização da eficiência da terapêutica, deteção precoce de recidivas e estabelecimento do prognóstico, quando utilizados com outros meios. (9)(11)

No laboratório da ULS da Guarda a metodologia para o doseamento dos marcadores tumorais é feito por Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA)

TABELA 9 — MARCADORES TUMORAIS - ARCHITECT CI8200

Analito	Descrição	Importância Clínica
Alfa-Fetoproteína	Glicoproteína fetal, sintetizada pelo fígado, saco vitelino e trato gastrointestinal. Importante componente do plasma fetal. Marcador de defeitos do tubo neural no feto em desenvolvimento. Propriedades físico-químicas e composição em aminoácidos semelhantes às da albumina. Monitorização de tratamento e detecção de recidivas.	<p>↑ Carcinoma hepatocelular;</p> <p>↑ Carcinoma de células germinativas;</p> <p>↑ Processos de regeneração hepática.</p>
Antigénio CA 125	Antigénio glicoproteico de superfície da família das mucinas, secretado a partir da superfície das células tumorais do ovário. Útil na avaliação da terapia e monitorização do cancro dos ovários, bem como de neoplasias do pulmão, mama, pâncreas e colón. Indicador de prognóstico e progressão do tumor.	<p>↑ Cancro dos ovários.</p>
Antigénio total específico da próstata (PSA Total)	Glicoproteína sintetizada na glândula da próstata é indicativa de patologia na mesma. Circula no sangue sob duas formas: PSA combinada (maioritária) e PSA livre.	<p>↑ Cancro da próstata;</p> <p>↑ Prostatite;</p> <p>↑ Hiperplasia benigna da próstata.</p>
Antigénio carbohidrato - CA 19.9	Glicoproteína do tipo mucina, de elevado peso molecular. Monitorização do tratamento e prognóstico do cancro do pâncreas, bem como do cancro nos ductos biliares, do colón e do reto. Identificado por anticorpos monoclonais.	<p>↑ Cancro do pâncreas e carcinoma gástrico. Indicador de progressão e prognóstico do tumor, monitorização do tratamento e das recorrências.</p>
Antigénio carcinoembrionário (CEA)	Glicoproteína pertencente ao grupo dos antígenos carcinofetais (proteínas oncofetais) que são produzidos durante o período embrionário. Encontra-se sobretudo no tracto gastrointestinal e no soro.	<p>↑ Cancro do pulmão;</p> <p>↑ Cancro da tiróide;</p> <p>↑ Cancro da mama;</p> <p>↑ Cancro do cólon;</p> <p>↑ Cancro do fígado;</p> <p>↑ Cancro do pâncreas;</p> <p>↑ Cancro da bexiga.</p>
Antigénio - CA 15.3	Antigénio glicoproteico tipo mucinoso. Marcador específico do cancro da mama, bem como do estômago e ovário.	<p>↑ Cancro da mama;</p> <p>↑ Significativo em metástases de outro tumor primário;</p> <p>↑ Cancro do ovário.</p>
HE4	Marcador para diagnóstico precoce do cancro do ovário	<p>A estratificação do risco e malignidade é feita pelo algoritmo Roma</p>
CYFRA 21.1	Antigénio formado por um fragmento de citoqueratina 19. Alta sensibilidade para o carcinoma de células escamosas. Fator de mau prognóstico no carcinoma de células escamosas do pulmão.	<p>↑ Carcinoma de células escamosas;</p> <p>↑ Patologias benignas pulmonares, gastrointestinais, ginecológicas, urológicas e da mama.</p>

1.12. Perfil Endócrino

TABELA 10 – PERFIL ENDÓCRINO - ARCHITECT CI8200

Analito	Descrição	Importância Clínica
Gonadotropina coriônica humana - β-HCG	Produzida na placenta durante a gravidez. Em mulheres não grávidas, também pode ser produzida por tumores do trofoblasto e não trofoblásticos e tumores das células germinais.	<p>↑ Aborto;</p> <p>↑ Tumores trofoblásticos e não trofoblásticos;</p> <p>↑ Tumores das células germinais com componentes trofoblásticos.</p>
Progesterona	A progesterona é produzida principalmente pelo corpo lúteo do ovário nas mulheres com menstruação regular, e em menor quantidade pelo córtex adrenal. As principais funções da progesterona relacionam-se com a preparação do útero para a implantação e manutenção da gravidez.	<p>↑ Gravidez;</p> <p>↓ Infertilidade.</p>
Prolactina	Responsável pelo desenvolvimento e diferenciação das glândulas mamárias.	<p>↑ Hiperprolactinemia (ausência de gravidez e lactação pós-parto);</p> <p>↑ Hipogonadismo;</p> <p>↑ Infertilidade</p>
Testosterona Total	Especialmente sintetizada pelo sexo masculino (células Leydig dos testículos).	<p>↓ Hipogonadismo;</p> <p>↓ Insuficiência testicular;</p> <p>↓ Infertilidade;</p> <p>↓ Hipopituitarismo.</p>
Sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S)	Androgénio supra-renal mais abundante, e que também funciona como neuroesteróide, produzido pelo córtex supra-renal. Indicador da produção supra-renal de androgénio. As concentrações séricas declinam com a idade, podendo ser utilizadas como fator de prognóstico em doenças graves e na progressão do cancro da mama.	<p>↑ Tumor supra-renal</p> <p>↑ Hiperplasia supra-renal congénita</p> <p>↑ Síndrome do ovário ploquístico</p>
Estradiol	Regula a função reprodutora feminina e, com a progesterona, mantém o estado de gravidez. A maior parte é segregado pelos ovários (mulheres não grávidas). Durante a gravidez, a placenta produz a maior parte do estradiol circulante. Por vezes, pode ser um indicador quanto à função ovárica.	O controlo dos níveis de estradiol é importante na determinação da amenorreia, da puberdade precoce e do início da menopausa, assim como da infertilidade masculina e feminina.

TABELA 10 – PERFIL ENDÓCRINO - ARCHITECT CI8200 (Continuação)

Analito	Descrição	Importância Clínica
Hormona folículo-estimulante humana (FSH)	Hormonas pertencentes à família das gonadotropinas, responsáveis por regular e estimularem o crescimento das gónadas (ovários e testículos). Utilizada no diagnóstico e monitorização de anomalias no sistema reprodutor.	<p>Mulheres:</p> <p>↑ Menopausa ↑ Hipofunção ovariana ↓ Hiperfunção ovariana.</p> <p>Homens:</p> <p>↑ Hipogonadismo primário ↓ Hipergonadismo.</p>
Hormona Luteinizante (LH)		↑ Doença policística ovariana.
Hormona estimuladora da tiróide - Tirotropina (TSH)	Glicoproteína utilizada no diagnóstico da tiróide. Permite também diferenciar os tipos de hipotiroidismo em primário, secundário e terciário.	<p>↑ Hipotiroidismo primário; ↓ Hipotiroidismo secundário ou terciário.</p>
Triiodotironina (T3)	Faz parte da regulação do metabolismo. Reflete alterações a nível da hormona T3 da função tiroideia, bem como diferencia o diagnóstico de eutiroidismo, hipertiroidismo e hipotiroidismo.	<p>↑ Hipertiroidismo; ↓ Hipotiroidismo.</p>
Tiroxina (T4)	Faz parte do sistema regulador da tiróide e influencia todo o metabolismo. Reflete alterações a nível da hormona T4 da função tiroideia.	
Tiroglobulina (TG)	Glicoproteína sintetizada nos folículos da tiróide é estimulada pela TSH para desempenhar um papel na síntese das hormonas T3 e T4.	<p>↑ Doença de Graves; ↑ Doença de Hashimoto.</p>
Cortisol	Principal hormona glucocorticoide segregada pelo córtex supra-renal. As suas funções fisiológicas incluem a regulação do metabolismo dos carboidratos e a distribuição de eletrólitos e água. Tem também um efeito imunossupressor e anti-inflamatório. Indicador direto do estado da glândula supra-renal e indicador indireto de hiper ou hipofunção da hipófise.	<p>↑ Tumor da glândula supra-renal ↑ Tumor da hipófise ↓ Hipofunção generalizada da glândula supra-renal ↓ Defeito no percurso metabólico da biossíntese do cortisol.</p>
Insulina	Sintetizada pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. O estímulo principal para a libertação de insulina é o metabolismo da glicose. A insulina promove o armazenamento de glicose, opondo-se à sua decomposição.	A hiperinsulinémia pode levar a hipoglicémia ou diabetes, aumento da síntese de VLDL, hipertensão e risco aumentado de doença cardiovascular.

No SPC da ULS da Guarda, a determinação das diferentes hormonas é feita por espectrofotometria, e por imunoenaios de micropartículas por quimioluminescência

1.13. Monitorização de fármacos

Os fármacos que requerem monitorização dos seus níveis plasmáticos possuem uma janela terapêutica estreitíssima, havendo uma concentração, à qual, o fármaco é efetivo, mas não tóxico. Estando o nível do fármaco abaixo do limite inferior, torna-se ineficaz, se ultrapassar o limite superior, é tóxico, podendo afetar, sobretudo, as funções hepática e renal.

Cabe ao laboratório o doseamento destes fármacos para que estabeleça o pico máximo e a vale de concentração para que a partir destes se possa traçar o perfil farmacocinético de um fármaco, para determinado doente, com todas as suas características fisiopatológicas individuais, de modo a obter as doses terapêuticas e regime posológico adequado à efetividade do fármaco administrado.

TABELA 11 — MONITORIZAÇÃO DE FÁRMACOS ARCHITECT CI8200

Analito	Descrição	Metodologia
Carbamazepina	<ul style="list-style-type: none"> - Controlo de convulsões; - Síndrome de Abstinência Alcoólica; - Bloqueador dos canais de sódio das membranas dos neurónios, reduz a intensidade e a frequência dos disparos neuronais e convulsões; - Depressão respiratória; - Hepatotoxicidade. 	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA)
Digoxina	<ul style="list-style-type: none"> - Glicosídeo cardiotónico para o tratamento de insuficiência cardíaca. - Tem efeito inotrópico positivo, aumentando a força de contração cardíaca. Reverte os efeitos da insuficiência cardíaca congestiva e diminui a frequência cardíaca, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e arritmias. 	Imunoensaios homogéneo - medição da alteração da dispersão da luz ou da absorvância
Teofilina	<ul style="list-style-type: none"> - Antiasmático utilizado no tratamento crónico da asma e de outras doenças broncopásmicas. Permite relaxar o músculo liso brônquico. - Hepatotoxicidade e Convulsões. 	Interação cinética das micropartículas numa solução KIMS
Valproato de sódio	<ul style="list-style-type: none"> Antiepilético utilizado para o tratamento das crises convulsivas. Hepatotoxicidade e trombocitopenia 	Imunoensaio enzimático homogéneo
Vancomicina	<ul style="list-style-type: none"> A vancomicina é um antibiótico utilizado para o tratamento de <i>Staphylococcus</i> produtores de beta-lactamases, e é o fármaco de eleição para o tratamento de <i>Staphylococcus aureus</i> metilino-resistentes (MRSA), e infeções graves causadas por bactérias Gram-positivas. - Inibe a síntese da parede celular da bactéria, levando à lise. - Produz ototoxicidade e nefrotoxicidade. 	Imunoensaio enzimático homogéneo
Lítio	<ul style="list-style-type: none"> Utilizado no tratamento de psicose maníaco-depressiva, o lítio tem uma semi-vida no soro de 48 a 72 horas, sendo eliminado pelos rins. 	Colorimétrica (Substrato: Porphirina)
Gentamicina	<ul style="list-style-type: none"> Medicamento anti-infeccioso e antibacteriano. 	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) in vitro

O laboratório faz ainda a monitorização do fenobarbital, fenitoína, antidepressivos tricíclicos, amicacina, tobramicina, salicilatos e paracetamol.

1.14. Monitorização de Drogas de Abuso

TABELA 12 – ARCHITECT CI8200: DROGAS DE ABUSO - DOSEAMENTOS REALIZADOS NA URINA.

Analito	Descrição	Metodologia
Canabinóides	Marijuana e/ou haxixe. Produzem efeitos alucinogénios e outros efeitos biológicos.	Ensaio Imunoenzimático
Anfetamina/Metanfetamina	Em doses elevadas causa excitação no sistema nervoso central, induz euforia, agilidade, apetite reduzido e uma sensação de energia e potência elevadas.	
Metadona	Narcótico utilizado para diminuir dores excessivas, sendo também utilizada no tratamento da dependência da heroína.	
Feniclidina	Produz sintomas clínicos que vão desde a confusão, desorientação, coma, e morte, em casos de sobredosagem.	
Opiáceos	Substâncias derivadas do ópio. Produzem analgesia, e em doses elevadas produzem euforia, estados hipnóticos e dependência.	
Benzodiazepinas	Grupo de fármacos ansiolíticos. Estes são aplicados em caso de ansiedade, insónias, convulsões e epilepsia. Doses elevadas levam a sonolência, tonturas, letargia e coma.	
Cocaína	Estimulante e anestésico, age diretamente no SNC. Uso provoca aumento de energia, inquietude e tremores.	
Álcool etílico	Atua inicialmente como estimulante, tendo de seguida efeitos depressivos sobre o Sistema Nervoso Central. O consumo excessivo de álcool leva a dependência física e psíquica.	

1.15. Perfil Vírico/Bacteriano

TABELA 13 – PERFIL VÍRICO- C8000/Ci8200 DA ABBOTT

Analito		Descrição Clínica	Metodologia
Vírus da Hepatite A (HAV-IgG)		A hepatite A é a forma mais comum da hepatite viral aguda (interesse na IgM), sendo que não assume uma forma crónica. A multiplicação dá-se a nível do fígado, podendo provocar problemas hepáticos.	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA)
Hepatite B	AgHBs	A hepatite B é responsável por problemas hepáticos graves. O primeiro marcador a aparecer após contacto com o vírus é o antigénio HBs, sendo que depois surge o antigénio do core (núcleo). Como resposta ao antigénio de superfície, surge o anticorpo HBs. Estes marcadores são os mais importantes clinicamente, pois em caso de positividade refletem a presença do vírus da hepatite B.	
	Anti-HBs		
	Anti-HBc total		
Hepatite C		A infecção pelo HCV conduz frequentemente a hepatite crónica e cirrose.	
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)		O vírus do HIV é responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), sendo que se multiplica abruptamente no organismo. Pode ser transmitido ao feto pela amamentação.	
Sífilis TP (IGM)		A sífilis é causada por infecção com a bactéria <i>Treponema pallidum</i> (TP) que pode ser transmitida congenitamente ou por contacto sexual.	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) para a deteção qualitativa de Ac contra a TP

TABELA 14 – VÍRUS DA HEPATITE B: COMPORTAMENTO DAS DIFERENTES FASES DE DOENÇA FACE AOS MARCADORES (18)

AgHBs	AgHBe	Anti-HBc	HBcTotal	Anti-HBe	Anti-HBs	Fase da doença
+	-	-	/	-	-	Incubação
+	+	+	/	-	-	Aguda/crónica Activa
+	+	-	/	-	-	Hepatite Crónica
+	-	+/-	/	+	-	Portador
+	-	-	/	+	-	
-	-	-	/	+/-	-	Período Janela (ou título de Acç Baixo)
-	-	-	/	+/-	+	Imunidade pós VHB
-	-	-	/	-	+	Imunidade pós Vacinação
-	-	-	/	-	-	Ausência de Contacto

1.16. Metabolismo Mineral Ósseo

Entre os vários processos homeostáticos do organismo, o metabolismo do cálcio é o elemento controlado mais rigidamente. Isso justifica-se pelo facto de o cálcio desempenhar um papel essencial na sinalização intracelular, na membrana plasmática celular e no controlo da função de proteínas extracelulares, como as que fazem parte da cascata da coagulação.

O cálcio, mineral requerido para a formação óssea e coagulação sanguínea, regula a permeabilidade das membranas ao sódio e potássio, e é importante na função muscular e neuronal. O seu largo espectro de ação exige um controlo complexo e multifacetado: as hormonas (paratormona, calcitonina), o equilíbrio ácido-base e o metabolismo da vitamina D e do fosfato influenciam os níveis de cálcio séricos. Assim, o cálcio é frequentemente doseado como screening de diversas alterações metabólicas.

A maior parte do fósforo do organismo (cerca de 80%) está presente na matriz óssea, sob a forma de hidroxapatite, a restante encontra-se sob a forma de fósforo inorgânico e ésteres de fosfato. O cálcio e o fósforo séricos apresentam geralmente uma relação de reciprocidade, ou seja, quando os níveis de cálcio diminuem, os níveis de fósforo aumentam e vice-versa.

A quantificação do fósforo é normalmente utilizada, em conjunto com outros parâmetros, no diagnóstico de alterações relacionadas com o metabolismo do cálcio.

O magnésio é um mineral essencial que está envolvido em várias funções bioquímicas. Desempenha um papel estrutural nos ácidos nucleicos e partículas ribossomais, é necessário como ativador para várias enzimas, sobretudo as que convertem energia para a função muscular, e participa na fosforilação oxidativa para a produção de energia. É importante na estrutura óssea, mais de 50% do magnésio do organismo está complexado com o cálcio e o fosfato, no osso. Aproximadamente 35% do magnésio no plasma está ligado a proteínas, como a albumina, pelo que as alterações na concentração de albumina podem afetar o magnésio. (16)

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel, obtida a partir do colesterol, podendo ser sintetizada na pele quando esta é exposta a radiação ultravioleta. Tem funções ao nível do desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, assim como na manutenção da hemóstase normal do cálcio e do fósforo. Através dos VDRs (vitamina D recetores) das membranas, aumenta o transporte de cálcio do meio extracelular para o intracelular, mobilizando-o também desse espaço. É de extrema importância na absorção do cálcio no intestino e estimula a absorção ativa de fosfato e magnésio. No osso, estimula os osteoblastos a

produzirem osteocalcina e fosfatase alcalina, aumenta o recrutamento, a diferenciação e a fusão dos osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea através destes, aquando da libertação de cálcio, de modo a manter os níveis extracelulares de cálcio. Por outro lado, a vitamina D possui um papel mediador em processos inflamatórios, autoimunitários, de doenças cardiovasculares, diabetes e cancro. O doseamento de vitamina D é utilizado para avaliar potenciais insuficiências desta vitamina.(17)

TABELA 15 – METABOLISMO MINERAL ÓSSEO ARCHITECT C8000/CI8200 DA ABOIT

Cálcio (Ca²⁺)	Utilizado no diagnóstico e tratamento da doença das paratiroides e de várias doenças ósseas, na monitorização de pacientes com insuficiência renal e transplante renal.	Hipercalcémia: Cancro; mieloma múltiplo; hipervitaminose; hiperparatiroidismo Hipocalcémia: Doenças renais crónicas; má nutrição; deficiência em vitamina D; osteomalacia; esteatorreia; hipoparatiroidismo.	Arsenazo III
Fósforo (P)	No organismo encontra-se sob a forma de fosfato. Auxiliar o diagnóstico das anormalidades das paratiroides, das doenças renais e desequilíbrios de Vitamina D.	Hiperfosfatémia: Insuficiência renal; hipervitaminose D. Hipofosfatémia: Doenças tubulares renais; hipovitaminose D com raquitismo.	Fosfomolibdato
Magnésio (Mg)	Maioritariamente intracelular. Importante para todos os processos metabólicos, bem como monitorização de insuficiências renais, perturbações cardíacas e neuromusculares.	Hiperfosfatémia: Insuficiência renal glomerular e coma diabético; hipervitaminose D Hipofosfatémia: Doenças tubulares renais; hipovitaminose D; perturbações neuromusculares; diarreia prolongada; síndrome da má absorção; hiperaldosteronismo; terapêutica diabética.	Enzimática (Substrato: Isocitrato desidrogenase)

Amostras: Soro, Plasma e Urina.

Método: Espectrofotometria.

1.17. Outros analitos

TABELA 16 – OUTROS ANALÍTOS

Analito	Descrição	Importância Clínica	Metodologia
ADA (adenosina deaminase)	Enzima conversora da adenosina em inosina - uma enzima envolvida no metabolismo das purinas. Está distribuída em todo organismo apresentando um papel importante no sistema imune, possui alta atividade nos linfócitos T e macrófagos.	↑ Diagnóstico da Tuberculose ↑ Mononucleose Infeciosa ↑ Febre tifóide ↑ Sarcoidose Crônica Ativa ↑ SIDA	Determinação cinética (a diminuição da absorvância do NADH, por oxidação para NAD, é proporcional à atividade da ADA na amostra)
SACE (enzima conversora da Angiotensina)	Produzida principalmente nas células epiteliais pulmonares, onde converte angiotensina I em angiotensina II regulando a pressão arterial. A angiotensina II estimula glândula adrenal para a produção de aldosterona.	Diagnóstico de doenças vasculares Diagnóstico e monitorização de sarcoidose Auxiliar diagnóstico de lepra Auxiliar diagnóstico de doença de Gaucher	Substrato: FAPGG Determinado pela comparação da taxa de reação obtida com o calibrador da enzima ACE.
Lactato	É um dos produtos finais da glicólise anaeróbia, o que ocorre em tecidos onde há hipoxia.	↑ Anóxia - resultante de doenças como pneumonia e insuficiência cardíaca congestiva	Ácido láctico em piruvato
Colinesterase	Também denominada de pseudocolinesterase tem grande valor para o diagnóstico de pacientes com a forma atípica da enzima e em intoxicações por inseticidas organofosforados.		DGKC butiriltiocolina a 37° C

1.18. Indicadores de doenças infecciosas

TABELA 17 — INDICADORES DE DOENÇAS INFECCIOSAS

Analito	Descrição Clínica
Citomegalovírus (CMV IgG; CMV IgM)	O citomegalovírus, pertence à família do vírus do herpes, e como tal apresenta infeções que ficam latentes durante toda a vida, com reativações ocasionais e com infeções recorrentes. A IgM indica infeção em fase aguda (recente), enquanto que a IgG em fase crónica.
Rubéola (Rub IgG; Rub IgM)	O vírus da rubéola causa um exantema viral, doença infecciosa aguda benigna, sendo que na mulher grávida atravessa a placenta e pode causar morte fetal ou malformações graves no feto. A IgM indica infeção em fase aguda (recente), enquanto que a IgG em fase crónica.
Toxoplasmose (ToxoIgG; ToxoIgM)	A toxoplasmose, infeção provocada pelo parasita intracelular obrigatório o <i>Toxoplasma gondii</i> , tem a capacidade atravessar a placenta e provocar patologia no feto. A IgM indica infeção em fase aguda (recente), enquanto que a IgG em fase crónica.
Vírus Epstein-Barr (EBV IgG; EBV IgM)	Também denominado de herpesvírus humano 4, é um dos vírus mais comuns em humanos, cuja transmissão ocorre pela saliva de pessoas contaminadas, mas pode haver transmissão por via sexual. O EBV é o agente causador de mononucleose infecciosa (MI) e também se encontra associado ao linfoma de Hodgkin e de Burkitt e ao carcinoma nasofaríngeo. A IgM indica infeção em fase aguda (recente), enquanto que a IgG em fase crónica.
Vírus da Hepatite A (HAV IgG)	Hepatite infecciosa aguda, altamente contagiosa sendo a sua transmissão do tipo fecal oral. Considerada uma hepatite, sem tratamento específico, mas de mortalidade baixa. A presença de anticorpos IgG anti-HAV, associada a um resultado de anticorpos IgM anti-HAV não reativo, indica infeção pelo vírus da hepatite A (HAV) ou vacinação contra o HAV.

Para além destes, outros testes como: *Herpes vírus 1 e 2*, *HTLV*, *Helicobacter Pylori*, *Chlamidea*, *Legionella spp*, e *coxiella* são realizados por imunológica.

V. MICROBIOLOGIA

A Microbiologia clínica é o ramo da Biologia que estuda os microrganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) capazes de produzir doença no homem. O objetivo é estabelecer a etiologia da infeção, identificação dos microrganismos e os testes de sensibilidade aos antibióticos.

Para a avaliação dos exames culturais temos de conhecer a epidemiologia e patogénese eventualmente presente no local de origem da colheita da amostra, do respetivo produto biológico, bem como os microrganismos habitualmente responsáveis pelas infeções, diferenciar culturas puras e quantitativamente significativas de culturas mistas, resultado de contaminação ou não, e valorizáveis clinicamente.

1. Equipamentos utilizados, métodos e parâmetros

1.1. Equipamentos

a) Sistema VITEK 2 (bioMérieux®)

O equipamento é um sistema integrado, automático que combina várias funções: preparação da amostra, incubação, leitura das cartas com identificação de Bactérias e de Leveduras e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. A identificação e os antibiogramas são executados através da monitorização contínua do crescimento e da atividade do organismo no interior das cartas. (19)

Identificação:

- Luz verde (identificação excelente, muito boa, boa ou aceitável) - a identificação é automaticamente transferida para o antibiograma;
- Luz amarela (baixa discriminação) - necessita de testes complementares (catálase, coagulase, oxidase, aspeto das colónias, etc);
- Luz vermelha (identificação inconclusiva) - repetir a carta de identificação.

Antibiograma:

- Luz verde (fenótipo consistente com a identificação) - a carta é automaticamente validada;
- Luz amarela (fenótipo fracamente inconsistente com a identificação) - indica correções biológicas;

– Luz vermelha (fenótipo inconsistente com a identificação) - mais de dois antibióticos com CMI's fora dos limites. Reavaliar a identificação e/ou Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA).

O resultado é apresentado para cada antibiograma como sensível, intermédio e resistente.

b) BACT/ALERT® 3D 60 (bioMérieux®)

O BacT/ALERT® 3D 60 é um sistema automatizado de incubação, agitação e monitorização de hemoculturas que deteta a existência de microrganismos na amostra testada pela produção de CO₂, uma vez que os microrganismos metabolizam os substratos existentes no meio de cultura. Se o crescimento dos microrganismos produzir CO₂ a cor do sensor existente no fundo de cada frasco de cultura muda de verde azulado para uma cor mais clara. Se o nível de CO₂ não se altera significativamente após cinco dias, a amostra é considerada negativa. As amostras consideradas positivas devem realizar a identificação do microrganismo e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. (19)

1.2. Principais atividades técnicas da microbiologia

a) Sementeiras e Isolamento de Colónias – efetuados em ambiente estéril com recurso a ansas estéreis descartáveis (10µL e 1µL) e calibradas, em meios de cultura apropriados.

b) Identificação de Bactérias e Fungos – nas diversas amostras biológicas por observação macroscópica e/ou microscópica de frescos e colorações (Gram, Ziehl-Neelsen), através da utilização de meios de cultura apropriados e por técnicas que têm por base propriedades bioquímicas específicas manuais ou automatizadas (aparelho Vitek® 2).

c) Teste de Sensibilidade aos Antibióticos – visando a obtenção de um conjunto de antibióticos de classes farmacológicas diferentes que podem ser prescritos pelo médico e administrados de modo a debelar a infeção presente detetada. Está implementada uma metodologia automatizada levada a cabo no aparelho Vitek® 2 e complementada por procedimentos manuais estipulados previamente, caso seja necessário.

1.3. Testes de identificação microbiológica

Os testes de identificação microbiológica baseiam-se num conjunto de procedimentos e técnicas que tem como finalidade o diagnóstico do agente etiológico responsável pela doença infecciosa em causa.

O organismo humano é colonizado por uma população de microrganismos numerosa e diversificada, a maioria dos quais constituindo uma flora em equilíbrio. Contudo em determinadas condições de desequilíbrio imunológico há a possibilidade de se desenvolverem bactérias ou fungos patogênicos oportunistas ou patogênicos obrigatórios, suscetíveis de causarem doença infecciosa.

O conhecimento do microbiota é muito importante na análise dos produtos biológicos que chegam ao laboratório, para que não sejam produzidos falsos resultados positivos e para que os verdadeiros agentes patogênicos possam ser identificados devidamente.

O exame microscópico das preparações coradas permite avaliar as características morfológicas das bactérias (forma, tamanho, arranjo celular e afinidade para os corantes). No Laboratório de Microbiologia as colorações mais utilizadas são a Coloração de Gram e a Coloração de Ziehl-Neelsen no caso das micobactérias. No entanto para avaliar a qualidade das amostras nas expectorações, antes mesmo do seu processamento pode-se fazer coloração de Leishman, podendo visualizar-se células epiteliais e leucócitos.

1.4. Meios de cultura

Os meios de culturas são preparações químicas, que possuem na sua formulação nutrientes necessários para que os microrganismos possam multiplicar-se, permitindo o seu estudo e análise em laboratório.

Pode-se separar os meios de cultura essencialmente em três categorias principais:

— **Não seletivos:** contêm nutrientes que favorecem o crescimento da maioria dos microrganismos. EX: Gelose de chocolate (PVX) e Gelose de Sangue (GS).

— **Seletivos:** contêm um ou mais agentes que inibem todos os microrganismos exceto os que se pretendem obter. EX: MAS (Manitol Agar), MacConkey .

— **Diferenciais:** permitem às colónias bacterianas exibir certas características, pela capacidade de metabolização de componentes específicos, que podem ser utilizadas para diferenciação de outras bactérias que crescem no mesmo meio. Ex: Meio Granada.

1.5. Morfologia de colónias e características metabólicas

As culturas de microrganismos resultam do processamento das amostras que chegam ao laboratório, onde depois de semeadas nos meios adequados ao seu crescimento, são observadas normalmente após 24/48 horas de incubação, a temperatura entre os 32° e 37° e

atmosfera que pode variar na concentração de CO₂, consoante as necessidades próprias de cada microrganismo e que levará à sua identificação.

1.5.1. Morfologia de colónias

A observação cuidadosa da morfologia das colónias é o primeiro passo na avaliação e interpretação de um meio de cultura inoculado, com crescimento, tendo em conta o contexto clínico, o produto e a patogenicidade, permitindo a decisão de valorizar (ou não) a cultura obtida. A sua interpretação fornece, normalmente, informação quanto ao género do(s) microrganismo(s) presente(s) e diretrizes para as técnicas de identificação com base em características metabólicas e propriedades bioquímicas que comprovam (ou não) as primeiras elações, podendo inclusive complementá-las com a informação sobre a espécie.

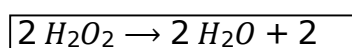
A interpretação das primoculturas pode levar à necessidade de repicagem para meios seletivos e/ou diferenciais de modo a que se possa obter colónias isoladas para identificação e determinação da suscetibilidade a antibióticos. Os meios seletivos são utilizados dada a vantagem de favorecem o crescimento de determinada bactéria em detrimento de outras pela presença de fatores essenciais a esse crescimento e/ou de antibióticos que suprimem o crescimento dos restantes grupos. Quanto aos meios diferenciais, são úteis na medida em que evidenciam visualmente características bioquímicas que permitem diferenciar grupos de bactérias.

1.5.2. Técnicas manuais que evidenciam características metabólicas e propriedades bioquímicas

Existem várias técnicas descritas, sendo utilizadas apenas algumas de forma rotineira e a maioria incorporadas em *kits* comerciais que funcionam como testes de identificação presuntiva.

- **Teste da Catalase**

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos organismos, que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) segundo a reacção química:



É usado em Microbiologia para distinguir estreptococos (catalase negativa) de outros cocos Gram(+) produtores de catalase, essencialmente, *Staphylococcus*. Deve ter-se cuidado ao fazer este teste com colónias que cresceram em meios com sangue, já que o sangue contém catalase, e um arrastamento de meio agarrado à colónia pode originar um falso positivo.

- **Teste da Coagulase**

Usado para distinguir *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) dos outros membros da família *Micrococcaceae*, genericamente designados *Staphylococcus* coagulase negativa. Pode ser realizado por duas metodologias diferentes: em tubo com plasma humano e por um kit comercial, por detecção do fator de aglutinação (reagente constituído por partículas de látex sensibilizadas com fibrinogénio humano e anticorpos anti-proteína A do *S. aureus* “clumping factor”). A vantagem do teste comercial, embora sendo mais caro é a rapidez, uma vez que o teste em tubo é bastante demorado (cerca de 4 horas), não sendo usado por rotina.

- **Teste da oxidase**

Usado para distinguir colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (oxidase negativa) de colónias de outros géneros como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Haemophilus spp* e *Pasteurella* (oxidase positiva). Foi efetuado usando um teste comercial com um indicador de oxi-redução. A oxidase é uma enzima intracelular que participa na cadeia respiratória de alguns microrganismos. O reagente da oxidase contém dimetilparafenilendiamina, que permite evidenciar a presença desta enzima pela alteração de cor.

- **Teste de sensibilidade à novobiocina**

Para identificação presuntiva de *S. saprophyticus* resistente à novobiocina.

- **Teste latex Pneumo**

Teste rápido de aglutinação para detecção do Ag capsular do *Streptococcus pneumoniae*.

- **Teste de sensibilidade à optoquina**

Teste que permite executar de uma forma simples a identificação presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*. Contudo, é importante referir que existem algumas estirpes destes microrganismos resistentes à optoquina, pelo que o resultado deste teste deve ser confirmado por recurso a outros testes. A optoquina inibe de forma seletiva o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em concentrações muito baixas. Os microrganismos que rodeiam o disco de optoquina sofrem lise, devido à variação da tensão superficial e é produzida uma área de inibição. O diâmetro do halo de inibição é medido e interpretado. Esta prova permite diferenciar *Streptococcus pneumoniae* dos restantes *Streptococcus* alfa hemolíticos.

- **Classificação serológica – Classificação de Lancefield**

A classificação de Lancefield baseia-se nas características antigénicas de um polissacarídeo de composição variável, chamado carbohidrato C, localizado na parede da célula dos *Streptococcus*.

A composição variável do carbohidrato C permite agrupar os *Streptococcus* em diferentes grupos designados por letras do alfabeto essencialmente A, B, D e F.

Esta prova baseia-se na pesquisa do carbohidrato C através de uma reação de aglutinação, pelo que são utilizados reagentes compostos por anticorpos específicos para cada um dos antígenos.

- **Identificação de microrganismos**

— **Género *Staphylococcus***, faz-se a prova da catálase que deve ser positiva, seguida da coagulase. Depois faz-se a deteção da resistência à metilcilina (MRSA), e de seguida a identificação automática pelo Vitek.

— ***Streptococcus* β hemolíticos grupo A (*Streptococcus pyogenes*)**, faz-se a prova de catálase que deverá ser negativa, seguindo-se a identificação serológica de Lancefield e identificação final pelo Vitek.

— ***Streptococcus* β hemolíticos grupo B (*Streptococcus agalactiae*)**, apresenta β hemólise fraca em gelose sangue, sementeira em meio cromogénico seletivo, teste presuntivo de lancefield e teste identificação em Vitek.

— ***Enterococcus* spp**, apresentam α hemólise em GS, prova de catálase negativa, sementeira em meio seletivo que permite a expressão das características na bÍlis esculina, de colónias com halo negro seguida da identificação pelo Vitek.

— ***Streptococcus pneumoniae***, apresenta colónias com α hemólise em Gs e prova da catalase negativa, seguindo-se o teste de aglutinação em latex pneumo, optoquina e identificação automática no Vitek.

— ***Listeria***, bacilo Gram positivo, apresenta β hemólise em GS e prova da catálase positiva, seguida da identificação em Vitek.

— ***Neisseria* e *Moraxella***, diplococos Gram negativos, dão prova da catálase e oxidase positiva, seguindo-se a identificação pelo Vitek.

— ***Haemophilus***, bacilos Gram negativos, não cresce em GS, mas em GC, segue-se a prova da catálase que é positiva e oxidase variável, seguindo-se a identificação pelo Vitek.

- **Bacilos Gram negativos**, crescem em MacConkey e CLED, são oxidase negativa para enterobactérias e identificação em Vitek, não esquecendo a identificação serológica da *E. coli*, *Shigella spp* e *Salmonella spp*.
- *Pseudomonas*, são bacilos Gram negativos não fermentadores, com prova da oxidase positiva.
- *Acinetobacter*, oxidase negativa e neste caso **cocobacilos** Gram negativos curtos, efetuamos E-test para imipenem, se a identificação e o perfil de sensibilidade aos antibióticos no Vitek se observar resistência para as cefalosporinas de 3ª geração, neste caso prosseguimos o estudo dos mecanismos de resistência BLSE, pesquisa de carbapenemases ou confirmação das resistências, executando os E-testes para além dos testes de sensibilidade aos antibióticos.
- *Klebsiela pneumoniae*, *Echerichia coli*, *K. oxytoca* e outras **enterobactérias**, bacilos Gram negativos. Neste caso como teste de despiste e confirmatório de BLSE, efetuamos E-test com cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxone, ceftadizima e aztreonamo.

2. Teste de sensibilidade aos antibióticos — Aparelho VITEK® 2

O Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA) avalia a capacidade de um antibiótico de inibir o crescimento de bactérias em cultura, permitindo a escolha mais eficaz da terapêutica a ser instituída ao doente. A seleção de antibióticos a serem testados deve ser uma decisão de cada laboratório clínico em conformidade com a Comissão de Farmácia e Terapêutica e a Comissão de Controle de Infecção, que geram diretrizes e uniformizam esta seleção. O Laboratório da ULS da Guarda segue as recomendações EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) de acordo com a norma da direção geral de saúde. (20)

Os testes de suscetibilidade disponíveis podem-se classificar em dois grandes grupos: método por difusão em gelose e método das diluições. O primeiro baseia-se no facto de um antibiótico depositado sobre uma gelose nutritiva se difundir segundo um gradiente de concentração. No método das diluições, utiliza-se uma série de poços reacionais com o mesmo inóculo e incorpora-se em cada tubo quantidades crescentes do antibiótico em estudo. A menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento da estirpe em causa, designa-se Concentração Mínima Inibitória (CMI). Quanto à sensibilidade a um determinado antimicrobiano, o microrganismo pode ser:

Sensível – se o antimicrobiano inibe o crescimento;

Resistente – se o antibiótico não inibe o crescimento bacteriano e é improvável uma boa resposta terapêutica às concentrações farmacologicamente aceitáveis do antibiótico e/ou está presente um mecanismo específico de resistência;

Intermediário – se o antibiótico age no crescimento, não sendo completa.

2.1. Metodologia VITEK

O aparelho VITEK® 2 é um equipamento destinado à identificação de bactérias e leveduras com relevância clínica e à realização do TSA. Permite a avaliação dos valores da CMI e a identificação de alguns fenótipos. São utilizadas as seguintes cartas colorimétricas:

a) Cartas de Identificação (baseadas em testes bioquímicos identificativos):

GN - carta de identificação para Gram (-);

GP - carta de identificação para Gram (+) e *Gardnerella vaginalis*;

YST - carta de identificação para leveduras;

NH - carta de identificação para *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter spp.* e microrganismos fastidiosos.

b) Cartas de Antibiograma (baseadas no método das diluições):

AST-N355 – antibiograma para bacilos Gram (-) aeróbios com significado clínico (maioria das bactérias isoladas em urinas);

AST-N354 – antibiograma para bacilos Gram (-) aeróbios com significado clínico não fermentadores, principalmente *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.*;

AST-P648 – antibiograma para Gram (+), para *Staphylococcus spp.*;

AST-P586 – antibiograma para Gram (+) com significado clínico, principalmente *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus spp.*;

AST-P576 – antibiograma principalmente direcionado para *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* β -hemolíticos nomeadamente *S.pyogenes* e *Acinetobacter spp.*;

Sto3- outros *streptococcus*

YST – identificação para fungos e leveduras;

NH – identificação para *Neisseria spp.* e *Haemophilus influenza*;

ANC – identificação para bacilos gram positivos.

A preparação das cartas é efetuada a partir de colónias isoladas. É transferido um número suficiente de colónias morfológicamente idênticas para uma solução salina estéril (3 mL), de modo a obter uma suspensão de microrganismos homogénea (solução mãe) livre de bolhas e que deverá ter uma densidade equivalente a um padrão McFarland (padrão de turvação). Para a identificação é utilizada a solução mãe, para o TSA é efetuada uma diluição apropriada em solução salina. A aspiração e a inoculação das cartas são automatizadas bem como a leitura das mesmas que é conseguida através de métodos turbidimétricos e colorimétricos.

3. Produtos biológicos – metodologias de análise

A decisão do modo de processamento das amostras biológicas e valorização clínica das estirpes isoladas, baseia-se na compreensão da patogenia da infeção nos diferentes locais anatómicos.

3.1. Urina

As infeções urinárias agudas são geralmente causadas por bactérias da flora intestinal saprófita, que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra, podendo atingir os rins causando as pielonefrites.

Os agentes etiológicos mais comuns são:

- **Bactérias Gram (-)** – Sobretudo as bactérias do género *Enterobactereaceae* com destaque para *Escherischia coli*, *Proteus spp.* e *Klebsiella spp.*
- **Bactérias Gram (+)** – O *Staphylococcus saprophyticus* é o mais representativo, mas os *enterococos spp.* também aparece com frequência.

No estudo bacteriológico consta:

- Observação do sedimento, de modo a avaliar a existência de resposta inflamatória e ainda a procurar a presença de bactérias ou fungos;
- Gram direto da amostra;
- Cultural (inclui sementeira, incubação e leitura), a urina é semeada em placa de CLED pela técnica de esgotamento usando uma ansa descartável de 10µL para permitir a valorização e contagem das colónias, sendo incubada durante 24 horas a cerca de 37°C.

A contagem de colónias é efetuada após valorização positiva do crescimento bacteriano. O número de colónias de interesse clínico na placa tem a seguinte correspondência com o número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL):

1 colónia	100 UFC/mL
10 colónias	1000 UFC/mL
100 colónias	10000 UFC/mL

3.1.1. Interpretação e identificação das colónias

Se a placa não tiver crescimento ou este for inferior a 10^5 consideramos de acordo com os critérios de procedimentos, que não tem significado clínico, não sendo feito identificação nem ATB, depois de se confirmar pela bioquímica o número de bactérias no sedimento, assim como o de leucócitos. Se, apesar de grande crescimento, a placa tiver mais do que três microrganismos, consideramos a cultura contaminada e como tal polimicrobiana, aconselhando, assim, a repetição de colheita asséptica.

De uma cultura primária pura com colónias superiores a 10^5 podemos passar à identificação e TSA. Se a urocultura não estiver pura procedemos à repicagem das colónias, ou sementeira para:

- **Meio MCK** (MacConkey) - suspeita de bactéria Gram (-)
- **Meio DCO** (Gelose D-Coccosel ou α -Esculina Agar) - suspeita de bactéria Gram (+)
- **Meio SGC** (meio sabouraud) - suspeita de fungos e leveduras

Assim, depois de se conseguir obter nestes meios colónias puras, pode-se passar à preparação da suspensão para identificação e/ou TSA no aparelho VITEK.

Teremos de considerar que:

- As colónias originadas por bactérias Gram (-) causadoras de infeções urinárias têm um aspeto cremoso ou mucoso que contrasta com as Gram (+) que são de aspeto mais seco;

- A principal bactéria causadora de infeções urinárias, a *E. coli*, apresenta normalmente na cultura primária (meio CLED) colónias com elevação de tamanho pequeno a médio amarelas, fermentadoras, com bordos regulares, brilhantes e de aspeto cremoso, contudo existem estirpes da mesma, Lactose (-), onde as colónias se apresentam de azul;

— Colónias sugestivas de *Pseudomonas spp*, possuem um aspecto mucoso e um odor intenso característico, cheiro a maçãs. Apresentam coloração esverdeada, não fermentadoras com bordos irregulares e uma taxa de crescimento elevada.

— Colónias sugestivas de *Proteus spp.* são transparentes, brilhantes, com elevação, de aspeto mucoso, podendo apresentar swarming. O meio permanece azul (bactérias Lactose (-) não fermentadoras) e emana um odor característico e desagradável.

— *Staphylococcus aureus*, identificação imediata por colónias amarelas de cocos no exame direto e catalase positiva a confirmar com o teste de aglutinação em látex.

— Bacilos Gram negativos oxidase (-) pertencem às *Enterobacteriaceae*, se for oxidase (+) são não *Enterobacteriaceae*.

— Cocos Gram positivo faz-se a prova da catalase. Esta, se for negativa, estamos na presença de *Streptococcus spp.*, e neste caso podemos fazer o teste de Lancefield para identificar o grupo, sendo o grupo D o mais comum e indicativo de *enterococcus*.

Se for positiva estamos na presença de *Staphylococcus spp.*, o teste de aglutinação em latex coagulase distingue-os e no caso de coagulase (-) temos a presença de *Staphylococcus coagulase (-)*, no caso de coagulase (+) estamos na presença de *Staphylococcus aureus*. (22)

3.2. Fezes

A coprocultura é um exame bacteriológico das fezes, utilizado em casos de gastroenterite maioritariamente. Os patogénicos de interesse clínico nestas enfermidades são: *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*. e *Yersinia enterocolitica* para além da pesquisa de *Staphylococcus aureus*. Nas crianças até um ano de idade é importante considerar também infeções por *Clostridium spp*.

Inicia-se com observação do Leishman para avaliar a presença ou não de sangue, leucócitos polimorfonucleares (o seu número pode ser indicativo de doença infecciosa), estado de equilíbrio da flora e depois o Gram.

Os meios de cultura usados no laboratório da ULS da Guarda, são:

- 1) **XLD - Agar desoxicolato-lisina-xilose:** meio seletivo para a diferenciação da *Salmonella spp* e *Shigella spp* proveniente de amostras de fezes humanas.

Inibe o crescimento dos microrganismos Gram positivo e outras *Enterobacteriaceae* que não a *Salmonella spp* e a *Shigella spp*, devido ao seu teor de sais biliares.

A diferenciação de organismos entéricos consegue-se através da incorporação de lactose no meio, assim, os organismos que fermentam a lactose produzem ácido que, na presença do

indicador vermelho de fenol, resulta na formação de colónias amarelas. Os organismos não fermentadores da lactose formam colónias vermelhas, por descarboxilação da lisina pela enzima descarboxilase (maioria dos elementos patogénicos intestinais, incluindo *Salmonella spp* e *Shigella spp*).

O tiosulfato de sódio e o citrato de amonia férrico permitem detectar a produção de sulfureto de hidrogénio (como se evidencia pelas colónias com centros pretos), que diferenciam a *Salmonella spp* pela produção de H₂S (22).

2) Meio seletivo *Yersinia*

Tornado seletivo pela inclusão de desoxicolato de sódio, cristal de violeta e alguns agentes antimicrobianos, permite a inibição seletiva de microrganismos Gram positivo e Gram-negativo. A fermentação do manitol do meio, na presença de vermelho neutro, resulta numa colónia característica com centro vermelho de *Yersinia spp*. (22).

3) Meio seletivo *Campylobacter*

O agar para *Campylobacter* com cinco agentes antimicrobianos e sangue de ovelha a 10% é recomendado como um meio seletivo para o isolamento e crescimento de *Campylobacter spp* de amostras fecais humanas. Permite assim o crescimento de *Campylobacter spp*, que produz colónias vermelhas escuras, planas e húmidas, após incubação a 37°C, em microaerofilia, 48-horas. (22).

4) Meio MSA e MRSA - Manitol Salt Agar

Com elevada concentração de NaCl (10%), seletivo para Gram (+) *Staphylococcus* e *Micrococcaceae*, uma vez que o nível de sal é inibidor de outras bactérias. O meio, contém vermelho de fenol, desta forma o *Staphylococcus aureus* produz colónias amarelas uma vez que fermentam o manitol, resultando substâncias ácidas que transformam o indicador em amarelo. Outros *Staphylococcus* coagulase negativos produzem colónias rosa escuro. Deste modo podemos ter a identificação presuntiva do microrganismo mais patogénico, o *Staphylococcus aureus* e verificar o grau de resistência que pode ter e desde já testada pelo meio MRSA.

Se MSA (+) isto é sugestivo de *Staphylococcus aureus*, confirma-se a resistência á metilcilina pelo meio MRSA, não fazendo a identificação porque como o microrganismo existe normalmente nas fezes só interessa saber se é portador. (22)

O exame parasitológico pode ser executado com a pesquisa de ovos, quistos e parasitas, recorrendo à observação macroscópica e microscópica de amostra de fezes, que permite detectar e pesquisar helmintas e protozoários patogénicos.

Os protozoários de maior incidência clínica são amibas (*Entamoeba histolytica*) e protozoários flagelados (*Giardia lamblia*); nos helmintas, os de maior incidência são *Fasciola hepatica*, *Schistosoma spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis spp.*, *Ancylostoma duodenale* e *Taenia spp.*

Segue-se três figuras de parasitas visualizados no laboratório.



FIGURA 3 — PARASITAS: *ENTEROBIUS VERMICULARIS*/*GIARDIA LAMBLIA*/*ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

3.3. Expetoração

A expetoração é um produto biológico de manuseamento delicado no Laboratório de Microbiologia, existindo protocolos e procedimentos definidos, tendo em vista a obtenção de resultados coerentes. A dificuldade na obtenção de uma amostra representativa do local de infeção, quer pela sua frequente diluição com saliva, quer pela contaminação inevitável com a flora saprófita do trato respiratório superior durante o seu trajeto, é uma realidade incontornável. Para obviar estas contrariedades a pesquisa de microrganismos patogénicos neste tipo de amostra restringe-se apenas aqueles cuja infecciosidade e patogenicidade está bem estabelecida: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*.

Ao microscópio é avaliada a qualidade da amostra em termos de número de células e de leucócitos e a presença de elementos leveduriformes e bactérias. Esta avaliação permite verificar se a amostra é representativa e adequada para processamento laboratorial, bem como, fornecer uma perspetiva do tipo de flora predominante.

Existem critérios nos procedimentos para a rejeição/aceitação de amostras de expetoração para o exame bacteriológico (observação de lamina corada de Leishman em objectiva 10x) e se o número for >25 células epiteliais por campo (independentemente do n.º de leucócitos) a amostra é imprópria para trabalhar, devendo ser pedida nova amostra de acordo com as recomendações do *Cumulative Techniques and Procedures Clinical Microbiology* (CUMITECH).

Para o exame cultural são semeados os seguintes meios:

- **Gelose de chocolate (PVX)** – um meio de isolamento que se destina mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes, tais como *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus pneumoniae*;
- **Gelose Columbia com 5% sangue de carneiro (COS)** – meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos, sendo um meio nutritivo muito rico adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, independentemente do seu metabolismo, a incubação pode ser até 2 dias a 37°C em atmosfera apropriada;
- **Gelose SGC** – incuba em aerofilia à temperatura ambiente até às 72 horas (apenas semeia este meio para os Aspirados Traqueo-Brônquicos, os Aspirados Brônquicos e os Lavados Bronco-Alveolares).

A valorização do crescimento bacteriano deve ter em atenção a contaminação inerente à passagem da expetoração pelo trato respiratório superior com conseqüente contaminação pela flora normal desta região. Desta forma, valorizamos expetorações com crescimento em placas de 10^7 e aspirados qualquer crescimento é considerado.

Quando aplicável, procede-se à identificação da bactéria isolada e ao TSA. No caso de *Streptococcus pneumoniae* deverá ser utilizado o teste de suscetibilidade à optoquina.

No caso de *Pseudomonas* faz-se o teste da oxidase como presuntivo, e só depois passamos à identificação e TSA. Se estivermos na presença de cocos Gram(+) com B-hemólise, fazemos catálase, o latex *Staphylococcus* e o MRSA antes mesmo da identificação definitiva.

3.3.1. Pesquisa de BAAR (bacilos ácido-álcool resistentes).

As bactérias do género *Mycobacterium* são o agente etiológico de infeção pulmonar crónica, a tuberculose, sendo o *Mycobacterium tuberculosis* o complexo mais frequentemente envolvido nesta infeção respiratória.

Para a pesquisa direta de BK (bacilo de Koch) na expetoração é efetuado um esfregaço pela técnica de estiramento, que após secagem e fixação pelo calor, é corado pela técnica de Zielh-Neelsen e outra lâmina para a fluorescência pela técnica da Auramina. As lâminas são observadas ao microscópio ótico com objetiva 100x sendo pesquisada a presença de *Mycobacterium spp.* Devem ser observados pelo menos 100 campos para que a amostra seja considerada como negativa pela ausência do BK.

As amostras depois de descontaminadas e tratadas são inoculadas em meio de Löwenstein-Jensen por descarga completa de 0,1 mL do sobrenadante da amostra descontaminada na rampa do meio e feito também a inoculação em MGIT (meio líquido para a deteção do BK).

Os tubos são incubados até 60 dias na estufa a 32 ° C e são observados todas as semanas. Sempre que se observe crescimento suspeito em algum deles efetua-se uma lâmina corada segundo o protocolo da coloração de Ziehl e Auramina para avaliar e pesquisar o BK.

Se e quando algum dos tubos for positivo e o crescimento for suficiente procede-se à identificação da bactéria e respetivo antibiograma. De salientar que a cultura em MGIT tem um prazo de deteção mais curto sendo hoje em dia imprescindível em todo o processo (23).

Se os tubos não apresentarem crescimento suficiente ou o “Ziehl” for negativo mantem-se na estufa até 60 dias, após o qual o resultado será dado como Negativo.

3.4. Hemoculturas

O sangue é um produto biológico estéril, assim o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura determina o agente etiológico.

As amostras de sangue são colhidas em frascos específicos para serem incubados no equipamento BacT/ALERT® que deteta, por espectrofotometria de infravermelhos, o dióxido de carbono resultante do metabolismo microbiano.

As amostras positivas, são então, sujeitas a:

- Exame microscópico do esfregaço corado por Gram;
- Exame cultural por subculturas em meios apropriados (PVX, COS e Sabouraud);
- Subsequente identificação e TSA do(s) microrganismo(s) isolado(s).

Ao fim de cinco dias de as garrafas não positivarem, é dado resultado negativo.

Os microrganismos mais frequentemente isolados no decorrer do estágio foram *Staphylococcus* coagulase negativo, *Staphylococcus aureus*, Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* e alguns fungos do grupo *Candida spp.* O processo que leva à identificação é igual ao que foi atrás descrito para os outros produtos, contudo no caso de *Streptococcus Pneumoniae*, uma vez que responde bem à penicilina como antibiótico de referência para esta bactéria, a dose dada ao doente será sempre a máxima dada a possibilidade de sépsis não havendo necessidade de determinar a MIC.

3.5. Exsudado nasal

A realização desta pesquisa tem particular interesse na detecção de portadores sãos de *Staphylococcus aureus* e de *Neisseria meningitidis*. A primeira bactéria é importante para a vigilância e controlo de surtos de infeção nosocomial e a segunda, no controlo da disseminação da infeção a partir de um caso de doença meningocócica. Contudo, pode também ser prescrita para isolamento de determinados microrganismos quando existam queixas e dados clínicos suscetíveis de tais infeções - *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae*.

- **Pesquisa de Eosinófilos** – faz-se a coloração de uma lâmina com o exsudado nasal pela coloração de Leishman, seguindo-se a observação ao microscópio de eosinófilos;
- **Exame Bacteriológico** – faz-se a sementeira em COS, PVX e MSA com incubação a 35-37° C, em atmosfera a 5% CO₂ para o PVX, durante 24 horas.

Esta pesquisa é usada essencialmente para fins epidemiológicos, no rastreio de portadores de *Staphylococcus aureus*. O processo de identificação é o mesmo que para os outros produtos.

3.6. Exsudado vaginal

Os exsudados vaginais são um auxiliar de diagnóstico nas infeções do aparelho genital feminino, que são habitualmente provocadas por microrganismos endógenos cuja patogenicidade é iniciada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrios da flora saprófita. A flora vaginal da mulher em fase reprodutiva é composta predominantemente por *Lactobacillus acidophilus*. São bacilos finos e compridos Gram (+), produtores de ácido láctico e peróxido de hidrogénio, que mantêm o pH vaginal ácido e impedem a proliferação de bactérias patogénicas.

A análise laboratorial começa por:

- Exame direto, faz-se pelo método de Gram onde se descreve a flora existente. São avaliados qualitativamente: células, leucócitos, eritrócitos (se presentes em quantidade significativa), leveduras e parasitas como *Trichomonas vaginalis*;
- Exames bacteriológico e micológico fazem-se por sementeira da amostra nos seguintes meios de cultura: PVX; Meio para Gardnerella, Meio VCA; Meio COS e Sabouraud.

Neste tipo de exsudado é valorizada a presença de colónias de *Mobiluncus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Trichomonas vaginalis*, *Streptococcus* do grupo B e fungos leveduriformes do género *Candida*.

Quando aplicável, procede-se à identificação da bactéria isolada e ao respetivo TSA.

3.6.1. Pesquisa de *Streptococcus* do grupo B

Nas gestantes do 3.º trimestre, reveste-se de grande importância a colonização vaginal pela bactéria *Streptococcus agalactiae*. Esta espécie não aporta qualquer situação de relevância clínica para a mulher, mas para o recém-nascido, que se contaminado na altura do parto, pode causar septicémia, meningite e pneumonia.

Esta pesquisa é efetuada a nível vaginal e a nível retal, como complemento.

As zaragatoas são semeadas em meio de Granada e depois de incubadas a cerca de 35-37°C durante 24 horas podendo prolongar-se em caso de cultura negativa. As placas são verificadas e a visualização de colónias alaranjadas é indicativo de *Streptococcus* do grupo B.

Faz-se de seguida e em caso de colónias isoladas o teste Lancefield para confirmar o grupo, e depois a identificação e TSA.

3.7. Exsudado Orofaringeo

Usado para a deteção de *Streptococcus* B-hemolítico do grupo A de Lancefield.

A sementeira é feita em **COS** (gelose Columbia + 5% sangue de carneiro), que contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos como os estreptococos. A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana (22).

Usamos também **PVX** (gelose de chocolate), meio de isolamento que se destina mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes como a *Neisseria spp*, *Haemophilus spp* e *Streptococcus pneumoniae* (22).

Incubação a 35-37° C, em atmosfera a 5% CO₂, durante 24 horas.

As colónias com β Hemólise podem ser repicadas para um meio de gelose de sangue, no qual é aplicado um disco impregnado com bacitracina 0,04 U (ao qual as bactérias a ser pesquisadas, *Streptococcus pyogenes*, são suscetíveis).

As colónias são valorizadas nas culturas com crescimento significativo de colónias suspeitas (dos microrganismos referidos) nos meios COS e PVX, considerando os dados clínicos

disponíveis e o grau de pureza da cultura, tendo sempre presente que a mucosa nasal é normalmente colonizada por uma flora comensal não patogénica.

3.8. Exsudado purulento de feridas

Os exsudados purulentos podem ser profundos ou superficiais. As secreções provenientes de supurações superficiais, abscessos ou líquidos serosos são heterogéneas tanto pela natureza dos agentes bacterianos como pela fisiopatologia da infeção. A metodologia para o estudo microbiológico de qualquer exsudado purulento deve considerar o local da infeção, a história clínica do utente, o tipo de utente (diabético, imunodeprimido, etc.), o tipo de infeção e o modo como foi efetuada a colheita.

Um esfregaço, efetuado preferencialmente no ato da colheita, corado pela técnica de Gram, permite a perceção da flora existente e de um eventual predomínio, e do grau de infeção pela quantidade de leucócitos presentes, sendo estes importantes na valorização de culturas.

No laboratório as amostras são semeadas em: PVX; COS; MacConkey; Manitol e Sabouraud.

Neste tipo de amostras biológicas é valorizada a presença de todas as estirpes presentes, procedendo-se à sua identificação e TSA.

Os genes etiológicos mais frequentes são:

- **Exsudados Purulentos Profundos**

Principalmente microrganismos anaeróbios.

- **Feridas**

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes*, *occusEntersopcp*, *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *Klebsiella spp.*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas spp.* e microrganismos aeróbios.

- **Exsudado Auricular - Otite média**

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*; e, mais raramente, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e anaeróbios. Nos recém-nascidos também pode estar implicado o *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B.

- **Exsudado Auricular - Otite externa**

Pseudomonas aeruginosa é o principal agente bacteriano. Os fungos do género *Aspergillus spp.* e *Candida spp.* também podem colonizar o canal auditivo normalmente em co-infeções bacterianas

- **Exsudado Ocular - Conjuntivites**

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*,
Moraxella catarrhalis,

Haemophilus influenzae, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*. No recém-nascido principalmente *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* por transmissão vertical durante o parto. Nos imunocomprometidos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*.

- **Exsudado Ocular - Infecções do Saco Lacrimal e da Córnea**

Nestas infecções podem estar implicados alguns fungos dos gêneros *Aspergillus* sp e *Candida* sp.

4. Exemplo de análises feitas no laboratório

Mulher, Maria A., 97 anos, urgência

Colheita de urina para análise microbiológica uma vez que havia suspeita de infecção urinária.

Análise sumária de urina: pH - 6,5; leucócitos - 500; eritrócitos - 250.

Sedimento: leucócitos 544; eritrócitos 30; bactérias 6463 contadas por citometria de fluxo

Análise microbiológica: Gram urina com muitos bacilos Gram negativo, superior a 10^5 ; cultura bacteriológica positiva depois de sementeado em Cled; identificação de bacilos não fermentadores no meio Cled, puros e cheiro a macãs, sugestivo de *Pseudomonas*. Teste confirmatório manual por oxidase positiva. Cultura micológica negativa. Identificação automática pelo Vitek de *Pseudomonas aeruginosa*. Carta N354 para antibiograma deu sensível a piperacilina/tazobactam e gentamicina. Deu resistente a ciprofloxacina e levofloxacina. Porém sensibilidade intermedia a imipenemo. Para confirmar a resistência intermedia fizemos o teste, o que confirmou a resistência com halo superior a 4 que pela EUCAST o que confirma a resistência.

VI. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO

O laboratório tem implementado um Sistema de Controlo de Qualidade que monitoriza as variáveis essenciais relativas aos ensaios, permitindo detetar precocemente desvios da qualidade, para que possam ser implementadas ações corretivas em tempo útil.

Os controlos interno e externo de qualidade têm como objetivo monitorizar continuamente os parâmetros de precisão e exatidão dos métodos implementados no laboratório, de forma a assegurar que, em qualquer momento, os resultados apresentam níveis de qualidade compatíveis com a utilização clínica desejada.

No sector da Bioquímica Clínica e antes do tratamento das amostras, são utilizados vários níveis de controlos comerciais para todos os parâmetros executados. A aceitação dos controlos baseia-se na interpretação de cartas de controlo e critérios do fornecedor (valores especificados nas respetivas bulas). O controlo de qualidade interno (CQI) no sistema automático é passado diariamente duas vezes e após a manutenção geral do aparelho (limpezas de agulhas e brancos). Existem, no entanto, algumas exceções caso de análises não efetuadas diariamente, como é o caso da Ag HBe. Neste caso, o CQI é passado antes de realizar a respetiva análise. Nas técnicas manuais e de imunofluorescência, o controlo é feito sempre que é feita a análise. As calibrações são realizadas sempre que necessário de acordo com as regras de Westgard, como por exemplo, em situações em que o controlo está fora dos limites, quando ocorre alteração do lote de reagente ou quando o fornecedor recomenda.

Relativamente ao controlo externo da qualidade, quer da Bioquímica Clínica quer da Microbiologia, o laboratório participa no Programa Nacional de Avaliação Externa do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), e LabQuality para a Bioquímica e também no *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UK-NEQAS) para a Microbiologia. Os resultados depois de avaliados pelas entidades dos programas, são fornecidos ao laboratório sob a forma de qualificações de forma a verificar a discrepância dos valores produzidos.

Este tipo de controlo permite avaliar a eficácia de reagentes, técnicas e equipamentos utilizados, detetando erros sistemáticos e fortuitos.

VII. CONCLUSÃO

Este estágio como parte integrante do MAC permitiu-me consolidar os conhecimentos teóricos, aplicá-los num contexto real de trabalho e desenvolver recursos individuais e capacidades técnicas.

O estágio em ambiente hospitalar, recebe uma grande variedade de amostras, o que se revelou uma experiência muito enriquecedora. Traduziu-se a nível laboratorial num contato riquíssimo com inúmeros casos clínicos que evoluem e se expressam de formas distintas, permitindo o reconhecimento de que o laboratório é uma constante aprendizagem onde a prática diária e uma base teórica sólida são essenciais.

Os objetivos iniciais propostos foram cumpridos. A integração na rotina laboratorial, com o contributo incansável de toda a equipa técnica, foi excelente, permitindo-me o manuseamento de amostras, dos vários equipamentos e a realização das vastas metodologias que aí estão implementadas. Todo o percurso, contribuiu de forma essencial para a articulação dos conhecimentos teóricos com a sua aplicação prática, visando a compreensão da contextualização dos vários achados laboratoriais, da importância dos mesmos e da necessidade de uma observação crítica antes de validar um resultado e transmiti-lo ao clínico.

De toda a experiência acumulada durante o estágio sobressai uma ideia fundamental e que é relativo ao cumprimento dos objetivos de um laboratório: proporcionar informação útil e fiável para o clínico na ajuda ao diagnóstico, implementação e monitorização da terapêutica e avaliação da evolução da doença.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) <http://www.corelaboratory.abbott>
- (2) <http://www.portalsaofrancisco.com.br>
- (3) SCHNEIDER. Nádia S H. - Fundamentos da Potenciometria. Ed DR. Santa Maria 1ª edição 2000 176pg.
- (4) - Manual de utilização do sistema Architectci8200 presente e facultado no laboratório central da ULS Guarda.
- (5) - Manual de utilização do sistema Architecti2000sr presente e facultado no laboratório central da ULS Guarda.
- (6) Manual do equipamento “Vidas 3”
- (7) SCOOT, Mitchell G.; LEGRYS, Vicky A.; KLUTTS, J. Stacey - Electrolytes and Blood Gases. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 431-449.
- (8) C. A. Burtis, E. R. Ashwood - “Tietz – Fundamentos de Química Clínica”, 4a edição, Guanabara Koogan, 1998.
- (9) J. Wallach - “Interpretação de Exames de Laboratoriais”, 8a Edicao, Guanabara Koogan, 2001.
- (10) DUFOUR, Robert - Liver disease. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G. Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 675-695.
- (11) R. A. Sacher, R. A. McPherson - “Widmann - Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais” , Manole, 2001.
- (12) LAMB, Edmund J.; PRICE, Christopher P. - Creatinine, Urea, and Uric Acid. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G. Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 363-372.
- (13) HIGGINS, Trefor; BEUTLER, Ernest; DOUMAS, Basil T. - Hemoglobin, iron, and bilirubin. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara

G. Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 509-527.

(14) JHONSON, A. Myron - Amino Acids and Proteins. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G. Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 286-316.

(15) APPLE, Fred S.; JAFFE, Allan S. - Cardiovascular disease. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G.. Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 614-630.

(16) ENDRES, David B.; RUDE, Robert K. - Disorders of bone. In BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E.; SAWYER, Barbara G. Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2008), pp 711-734.

(17) Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. [homepage on Internet] Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v53n5/15.pdf>; e Procalcitonina- Riedels, et al. Procalcitonina as a marker for the detection of bacteriemia and sepsis in the emergency. Am J., clin Pathol 2011;135:182-89.

(18) https://www.roche.pt/hepatites/tabela_hepatite_b.pdf, interpretação de dados serológicos.

(19) www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-compact

(20) www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-bactalerr

(21) C. R. Mahon, G. Manuselis . - "Textbook of Diagnostic Microbiology", 2a ed, Saunders Company, 2000.

(22) <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9082>

(23) Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia - pesquisa de BAAR e exame cultural em Lowenstein.