



Joana Vanessa Ferreira Ramos

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela
Dra. Fátima Maria Madureia Vale e pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio
e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Vanessa Ferreira Ramos

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Fátima Maria
Madureia Vale e pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“O caminho faz-se caminhando...”
António Machado

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Barata Antunes Custódio pela orientação no trabalho e preciosas sugestões.

À Doutora Fátima Madureira Vale um especial e sincero agradecimento pela constante motivação, atenção e por sempre me ter proporcionado a disponibilidade necessária para este trabalho.

À minha avó e às minhas tias pelo constante encorajamento.

À minha tia Ana pelo contributo neste trabalho.

Ao Pedro pela enorme paciência e cumplicidade e por estar sempre presente de uma forma tão especial.

À minha irmã por ser a minha pessoa.

À minha mãe por tudo.

Índice

Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iii
Lista de abreviaturas	v
Resumo	vii
Abstract	ix
1 Introdução	1
2 O Serviço de Patologia Clínica do Hospital Sousa Martins.....	1
3 Bioquímica Clínica	3
3.1 Organização e equipamentos.....	3
3.2 Fase pré-analítica.....	4
3.2.1 O paciente	5
3.2.2 A amostra	5
3.2.3 Receção de amostras	7
3.2.4 Sistema automatizado de triagem.....	7
3.3 Fase analítica	9
3.3.1 Parâmetros bioquímicos analisados	11
1. Ionograma	11
2. Perfil hepático	12
3. Perfil pancreático	14
4. Perfil renal.....	15
5. Perfil lipídico.....	16
6. Perfil endócrino.....	17
7. Metabolismo do ferro	20
8. Proteínas séricas.....	21
9. Marcadores cardíacos	24
10. Marcadores tumorais.....	25
11. Monitorização de drogas terapêuticas.....	26
12. Controlo de drogas de abuso.....	27
13. Outros analitos sanguíneos	27
3.3.2 Análise de Urinas	28
3.4 Fase pós-analítica	29
4 Microbiologia aplicada à clínica.....	30
4.1 Organização e equipamentos.....	30
4.2 Fase pré-analítica.....	30
4.3 Fase analítica – Métodos de diagnóstico	31
4.3.1 Exames microscópicos diretos – técnicas de coloração.....	32
4.3.2 Exame cultural – meios de cultura.....	33

4.3.3	Testes orientativos / de identificação presuntiva	38
4.3.4	Identificação bacteriana	40
4.3.5	Testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.....	41
4.3.6	Produtos processados para exame cultural.....	42
1.	Sangue.....	43
2.	Líquido cefalorraquidiano.....	44
3.	Outros líquidos normalmente estéreis.....	45
4.	Amostras do trato respiratório superior.....	45
5.	Amostras do trato respiratório inferior.....	46
6.	Amostras do aparelho auditivo e ocular	48
7.	Amostras de feridas, pús e tecidos.....	49
8.	Urina	50
9.	Exsudados vaginais e uretrais.....	51
10.	Fezes	52
4.3.7	Microbiologia serológica e antigénica.....	54
4.4	Fase pós-analítica	60
5	Controlo de Qualidade.....	61
6	Conclusão.....	63
7	Referências Bibliográficas.....	65

Lista de figuras

Figura 1 - Sistema automatizado de triagem - Acceleratorp540.....	8
Figura 2 - Diagrama do fluxo de trabalho do Acceleratorp540	8
Figura 3 - Curvas de aparecimento dos biomarcadores cardíacos.....	25
Figura 4 - Sistema automático de identificação bacteriana - Vitek®2 Compact.....	40
Figura 5 - Cartas de identificação de microrganismos utilizadas pelo Vitek®2 Compact	41
Figura 6 - Sistema de incubação de hemoculturas - Bactalert 3D	43
Figura 7 - Produção de anticorpos em relação ao tempo	54
Figura 8 - Capacidade de ligação dos anticorpos IgG	55
Figura 9 - Resposta de anticorpos dependente do tempo a vários antígenos produzidos durante o ciclo de vida do vírus de Epstein-Barr.	58
Figura 10 - Evolução dos marcadores do vírus da hepatite B (HBV) nas infeções agudas e crónicas	60

Lista de tabelas

Tabela I - Equipamentos utilizados na fase analítica no setor da Bioquímica Clínica.....	10
Tabela II - Distribuição dos principais microrganismos da flora comensal.....	32
Tabela III - Classificação dos meios de cultura	34
Tabela IV - Meios de cultura sólidos utilizados.....	35
Tabela V - Técnicas de sementeira usadas no laboratório de Microbiologia.....	37
Tabela VI - Condições ótimas de crescimento de microrganismos patogénicos	38
Tabela VII - Testes orientativos / de identificação presuntiva de microrganismos	39
Tabela VIII - Tabela de Murray e Washington	47

Lista de abreviaturas

ADA - Adenosina Desaminase
ALP - Fosfatase Alcalina
ALT - Alanina Aminotransferase
AST - Aspartato Aminotransferase
AVC - Acidente Vascular Cerebral
BNP - Peptídeo Natriurético
CA 125 - Antígeno 125 do Cancro
CA 15.3 - Antígeno 15.3 do Cancro
CA 19.99 - Antígeno Carbohidrato
CAM - Gelose Campyloset
CAN - Gelose de Candida
CEA - Antígeno Carcinoembrionário
CK - Creatinina - quinase
CK-MB - Creatinina-quinase - MB
CLED - Gelose Cystine Lactose Electrolyte Deficient
CUMITECH - Cumulative Techniques and Procedures Clinical Microbiology
DCO - Gelose D-coccosel
DHEA-S - Sulfato de Dehidroepiandrosterona
EBV - Vírus Espstein-Barr
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELFA - Enzime Linked Fluorescent Assay
FSH - Hormona Folículo-estimulante Humana
GAR - Gelose Gardnerella
GC - Gelose de Chocolate
GRAN - Gelose Granada
GS - Gelose de Sangue
HAV - Vírus da Hepatite A
HbA1c - Hemoglobina Glicada A1c
HBV - Vírus da Hepatite B
HDL-C - High Density Lipoprotein Cholesterol
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
IDL-C - Intermediate Density Lipoprotein Cholesterol
IgA - Imonoglobulina A
IgG - Imonoglobulina G
IgM - Imonoglobulina M
ISEs - Tecnologia de Elérodos para Iões Específicos
LDH - Lactato Desidrogenase
LDL-C - Low Density Lipoprotein Cholesterol
LH - Hormona Luteinizante
MCK - Gelose MacConkey
MIC - Concentração Inibitória Mínima
MRSA - Gelose *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina

MSA - Gelose Manitol Salgado
PCP - Fenciclidina
PCR - Proteína C-reativa
PCT - Procalcitonina
PSA Total - Antígeno Total Específico da Próstata
PTGO - Prova de Tolerância à Glicose Oral
PTH - Hormona Paratiroideia
RPR - Rapid Plasma Reagin
SACE - Enzima Conversora da Angiotensina
SGA - *Streptococcus* do grupo A
SGQ - Sistema de Gestão de Qualidade
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Aquirida
SPC - Serviço de Patologia Clínica
T3 - Triiodotironina
T4 - Tiroxina
TFG - Taxa de Filtração Glomerular
TG - Tiroglobulina
TGL - Triglicéridos
TIBC - Capacidade Total de Ligação do Ferro
TnT - Troponina T
TP - *Treponema Pallidum*
TRH - Hormona Libertadora de Tireotrofina
TSH - Hormona Estimuladora da Tireoide
ULS - Unidade Local de Saúde
USF - Unidade de Saúde Familiar
VDRL - Venereal disease research laboratory
VLDL-C - Very Low Density Lipoprotein Cholesterol
XLD - Gelose Xilose-Lisina-Desoxicolato de sódio
YER - *Yersinia* agar
β-HCG - Gonadotropina Coriônica Humana
γGT - Gama-glutamil Transferase

Resumo

O estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas decorreu de dezembro de 2017 a junho de 2018 no Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda.

O Serviço de Patologia Clínica desta Unidade Local de Saúde é um serviço constituído por 6 unidades laboratoriais que prima pela competência técnica e pela qualidade dos resultados.

No decorrer do estágio integrei cada um destes setores e desenvolvi competências técnico-científicas que muito me enriqueceram profissionalmente. Além disso, apreendi a necessidade de trabalhar segundo um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) como fator diferenciador de um serviço de excelência e como forma de garantia de qualidade analítica.

Apesar das inúmeras áreas que compõem um laboratório de análises clínicas, este relatório visa uma abordagem mais profunda sobre as áreas de Bioquímica Clínica e de Microbiologia.

Pretende-se com o presente relatório fazer uma breve descrição do laboratório de Bioquímica e do laboratório de Microbiologia tanto em relação à organização e funcionamento, como às tecnologias e metodologias analíticas aplicadas.

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

Abstract

The curricular internship of the Master's Course in Clinical Analysis took place from December 2017 to June 2018 in the Department of Clinical Pathology of the Local Health Unit of Guarda.

The Department of Clinical Pathology consist in 6 laboratories that excel for the technical competence and the quality of the results. During the internship I took part in each one of these sectors and developed technical-scientific skills that greatly enriched me professionally. In addition, I learned the need to work under a Quality Management System as a differentiating factor of excellence and as a form of ensuring analytical quality.

Despite the many areas that make up a clinical laboratory, this report aims at a deeper approach to the areas of Clinical Biochemistry and Microbiology. The purpose of this report is to provide a brief description of the Biochemistry and Microbiology laboratories in terms of both organization and operation, as well as the technologies and analytical methodologies applied.

Key words: Clinical Biochemistry, Microbiology, Clinical Analysis, Biochemical Parameters, Microorganisms.

I Introdução

Enquanto ciência em constante evolução, a Medicina Laboratorial obriga que todos os intervenientes mantenham uma atualização permanente. As novas abordagens fisiopatológicas, a automatização e o desenvolvimento de novas tecnologias requerem uma atitude crítica profunda que tem como base o conhecimento teórico e técnico adquirido ao longo do percurso académico e profissional, uma vez que se trata de uma matéria onde não há verdades absolutas nem técnicas infalíveis.

O Laboratório de Análises Clínicas é um parceiro indispensável no auxílio e na confirmação do diagnóstico, prognóstico e terapêutica, sendo de extrema importância que todo o trabalho assente na Qualidade Analítica e na Competência Técnica. Para se conseguirem atingir níveis máximos de confiança, os procedimentos e as metodologias devem garantir a fiabilidade dos resultados emitidos, o que implica uma organização baseada no fluxo da amostra, na celeridade, no rigor, na precisão e na exatidão do resultado.

Apostar no diagnóstico precoce da doença é uma opção que traz numerosos benefícios, não só, na melhoria da qualidade de vida dos utentes, mas também dos ganhos na Saúde. Neste sentido, é importante a sensibilização da população no recurso às análises clínicas como meio de diagnóstico precoce.

2 O Serviço de Patologia Clínica do Hospital Sousa Martins

A Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda presta cuidados de saúde primários, diferenciados e continuados. A sua área de influência corresponde aos concelhos de Almeida, Celorico da Beira, Figueira de Castelo Rodrigo, Fornos de Algodres, Gouveia, Guarda, Manteigas, Meda, Pinhel, Sabugal, Seia, Trancoso e Vila Nova de Foz Coa.[1]

O Serviço de Patologia Clínica (SPC), onde decorreu o presente estágio, dirigido pela Dra. Fátima Maria Madureira Vale, é um Serviço de Suporte à Prestação de Cuidados numa vertente de apoio clínico e técnico, e está localizado no Hospital Sousa Martins na Guarda, funcionando como laboratório central da ULS da Guarda. Chegam a este laboratório, amostras das seguintes unidades[2]:

- Hospital Sousa Martins - Guarda
- Hospital Nossa Senhora da Assunção - Seia
- Agrupamento de Centros de Saúde da Guarda:
 - Centro de Saúde de Almeida

- Centro de Saúde de Celorico da Beira
- Centro de Saúde de Figueira de Castelo Rodrigo
- Centro de Saúde de Fornos de Algodres
- Centro de Saúde de Gouveia
- Centro de Saúde da Guarda
- Centro de Saúde de Manteigas
- Centro de Saúde de Pinhel
- Centro de Saúde da Meda
- Centro de Saúde do Sabugal
- Centro de Saúde de Seia
- Centro de Saúde de Trancoso
- Centro de Saúde de Vila Nova de Foz Coa
- Unidade de Saúde Familiar da Ribeirinha (USF)
- Centro de Diagnóstico Pneumológico Guarda

○ SPC da ULS da Guarda engloba 6 unidades laboratoriais:

- Laboratório de Hematologia
- Laboratório de Bioquímica
 - Química Geral
 - Endocrinologia
 - Serologia
 - Eletroforese proteínas/Imunoglobulinas/Imunosubtração
- Laboratório de Biologia Molecular
- Laboratório de Imunologia
- Laboratório de Microbiologia
- Laboratório de Micobacteriologia

3 Bioquímica Clínica

A Bioquímica Clínica é a área das Análises Clínicas que integra a determinação de inúmeros analitos e a sua utilização no diagnóstico, tratamento e monitorização da doença. Atualmente, a secção da bioquímica está integrada na secção da imunoquímica, uma secção muito vasta e que integra a análise de vários parâmetros nomeadamente bioquímicos, imunológicos e serológicos, em diferentes produtos, sendo que o soro é o tipo de amostra mais utilizado.

É o setor que apresenta o maior fluxo de amostras diariamente e é, provavelmente, o setor mais automatizado.

3.1 Organização e equipamentos

Para o processamento das análises bioquímicas, existem na secção inúmeros equipamentos, nomeadamente, o Acceleratorp540, o Architectci8200, o Architectci2000sr, o VIDAS 3, o IMAGE, o Urisys 2400 e o UF-1000i (Tabela 1). Estes equipamentos permitem a análise das amostras de forma rápida e eficaz, através de diferentes metodologias, sendo que, os principais métodos instrumentais de análise na área da bioquímica são a potenciometria, a fotometria e a quimioluminescência.[3]

A potenciometria é um processo eletroquímico no qual a diferença de potencial entre um eléctrodo indicador e um eléctrodo de referência é medida enquanto não é permitido fluxo de corrente na célula eletroquímica. A célula é constituída por dois eléctrodos, um eléctrodo de referência cujo potencial é constante, conhecido e insensível à composição da solução a analisar, e um eléctrodo indicador com uma resposta rápida e reproduzível, seletivo para o ião a analisar. Ambos os eléctrodos estão ligados a um voltímetro, que compara o potencial medido com o potencial do eléctrodo de referência. O potencial corresponde à atividade do ião e está diretamente relacionado com a sua concentração na solução.

A fotometria é uma técnica que mede a quantidade de luz absorvida por uma dada substância (resultante de uma reação enzimática, colorimétrica ou turbidimétrica) em solução quando esta é atravessada por um feixe de luz com um comprimento de onda determinado. O método depende da capacidade que o analito ou um derivado do analito tem em absorver a luz. A intensidade da luz transmitida pela lâmpada, ao passar pela solução que contém a substância absorvente, diminui por ser, em parte, absorvida. A fração de luz transmitida é então detetada pelo foto-detetor, medida e usada para determinar a concentração do analito em questão.

A 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 eletrão 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 complexos metálicos. É um método ultra sensitivo, usado num vasto leque de imunoensaios automatizados competitivos e não competitivos em sandwich, que utilizam anticorpos ou antigénios 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. É um ensaio não competitivo em sandwich, em que o sinal medido é diretamente proporcional à concentração de analito na amostra.

Todos os equipamentos são preparados e controlados no início de cada turno de trabalho, ou seja, são verificados os níveis de reagentes e de consumíveis (pontas, cuvetes de reação, soluções de lavagem) de cada equipamento e são processados pelo menos dois níveis de controlo de qualidade interno, para cada parâmetro analisado. Sempre que necessário (novo lote de reagente, término do prazo de calibração ou falhas nas regras de controlo de qualidade interno), as diferentes técnicas são calibradas recorrendo aos calibradores fornecidos pelas casas comerciais.

Quando todos os equipamentos estão preparados e controlados, as diferentes amostras são processadas e os resultados devidamente analisados. Os resultados anormalmente altos ou baixos, bem como os resultados fora dos limites de linearidade, são assinalados pelo sistema de acordo com as regras previamente estabelecidas. Todos os resultados são analisados em concordância com o índice de hemólise, índice lipémico e ictérico (calculados automaticamente pelo aparelho), pois são dados que muito frequentemente interferem com parâmetros processados.

Depois de concluído todo o processo analítico, o técnico superior especialista faz a validação biopatológica e envia eletronicamente o relatório.

3.2 Fase pré-analítica

A fase pré-analítica engloba os processos de marcação dos exames, recolha de informação sobre a preparação e a inscrição do utente, a recolha e preparação das amostras biológicas e o seu transporte para o laboratório. É considerada a fase mais importante das análises

clínicas, pois é onde ocorre a maior percentagem de erros que afetam a fase analítica e dificultam a interpretação e validação dos resultados. Estes erros podem ser minimizados se os profissionais estiverem comprometidos com determinadas regras e é, por isso, muito importante o estabelecimento de procedimentos que visam avaliar, monitorizar e melhorar todas as etapas constituintes da fase pré-analítica.

Esta fase envolve cuidados a diferentes níveis, nomeadamente do paciente, da amostra e da sua receção e triagem.

3.2.1 O paciente

O paciente deve receber todas as informações necessárias para a realização do exame e não se deve esperar que as orientações sejam dadas pelo médico, mas sim pelo laboratório. O paciente deve receber do laboratório informações, verbais e/ou escritas, sobre os cuidados a ter nesta fase de pré-colheita de amostras, tais como os tempos de jejum, a ingestão de bebidas alcoólicas, os tipos de medicamentos que não devem ser consumidos, entre outras, e que podem interferir diretamente na qualidade do material colhido.

Outra tarefa importante nesta fase é o registo do utente, cujos dados pessoais devem estar corretos para diminuir qualquer erro eventual, especialmente entre a identificação do paciente e a amostra.

3.2.2 A amostra

A amostra fornecida deve ser apropriada para o teste solicitado, por exemplo, o soro é necessário para a eletroforese de proteínas e o plasma para medir a atividade da renina. Por outro lado, a colheita de amostras para frascos errados pode levar a resultados incorretos, uma vez que podem surgir interações entre o anticoagulante utilizado e o analito em estudo (por exemplo, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) usado como anticoagulante combina-se com o cálcio presente no soro e diminui a sua concentração).

Todas as amostras devem ser corretamente identificadas e transportadas o mais rapidamente possível para o laboratório e quando assim não for possível, ou quando a amostra tiver de ser enviada para um laboratório de referência no exterior para ser analisada, devem ser cumpridos os requisitos de armazenamento e transporte da amostra para os analitos/método em causa.

Nesta etapa da fase pré-analítica, as falhas mais comuns são a colheita de quantidade insuficiente de amostra, amostra colhida em tubo incorreto, tipo de amostra colhida inadequada ao pedido e identificação incorreta (do paciente e da amostra).

Colheita de sangue

Como já foi referido, na área da Bioquímica o soro é o produto de eleição para a realização das análises, sendo que este deve ser colhido em tubo seco com gel separador. Contudo, diferentes tubos podem ser usados para colheita de sangue de acordo com a análise que irá ser processada:

- Tubo sem anticoagulante (tubo seco com gel separador – para maioria das análises imunoquímicas) - SORO
- Tubo com EDTA sódico (determinação de amónia e/ou peptídeo natriurético (BNP)) - PLASMA
- Tubo com Fluoreto de sódio + EDTA (determinação de glucose e lactato) - PLASMA
- Tubo de Homocisteína (determinação de homocisteína) - PLASMA
- Tubo com Heparina (determinações especiais de bioquímica - Zinco, Chumbo, Cobre) - PLASMA
- Seringa com Heparina (gasimetria) - SANGUE TOTAL

Colheita de urina

A urina é outro dos produtos frequentemente analisados em Bioquímica, sendo que o tipo de amostra de urina a ser colhido e o procedimento da colheita depende dos testes a serem executados.

➤ Urina para Urina Sumária e Sedimento Urinário:

A colheita de urina para Urina Sumária e/ou para Sedimento Urinário é de execução fácil, sendo geralmente realizada pelo próprio utente. Para isso, basta recolher a primeira urina da manhã para um recipiente estéril e fechado que deverá ser entregue no laboratório com a maior brevidade possível.

➤ Urina de 24 horas:

A colheita da urina de 24 horas implica a recolha de todas as micções realizadas durante 24 horas. A primeira urina da manhã deve ser rejeitada, seguido do armazenamento de todas as urinas daquele dia, inclusive da primeira urina do dia seguinte, a fim de completar as 24 horas.

Esta urina é usada para avaliar o funcionamento dos rins, pois através dos resultados da urina de 24 horas é possível definir a taxa de filtração glomerular, pesquisar a presença de proteínas na urina e identificar as concentrações na urina de vários sais minerais, entre eles, sódio, potássio, cálcio e fósforo. Permite ainda determinar parâmetros bioquímicos cujas concentrações sofram alterações ao longo do dia, como é o caso da creatinina, do cortisol ou do péptico C.

3.2.3 Receção de amostras

Após a colheita, as amostras são entregues no SPC da ULS da Guarda devidamente acondicionadas e com as respetivas requisições, providas de uma etiqueta com um número próprio, associado a um código de barras que acompanha a amostra em todo o seu processamento. As amostras obtidas em extensões do Hospital Sousa Martins (Centros de Saúde do distrito) são entregues ao laboratório, em arcas cujas condições de transporte (tempo de transporte e temperatura) são controladas através de um sistema de controlo e registo de temperatura (“logger”). Posteriormente, as amostras são triadas e os tubos correspondentes a análises imunoquímicas são centrifugados a 3000 rpm por cerca de 10 minutos para obtenção do soro ou plasma. Sempre que possível e, apesar de automaticamente ser feita a leitura dos índices de qualidade da amostra, deve ser verificado se a amostra se encontra excessivamente hemolisada, lipémica ou ictérica, ou com qualquer outro tipo de alteração.

Seguidamente, as amostras são colocadas no Acceleratorp540.

3.2.4 Sistema automatizado de triagem

Pensado e adaptado especificamente à dinâmica e workflow do laboratório, este sistema de triagem - Acceleratorp540 (Fig. 1) - separa as amostras de acordo com o pedido de análise, faz alíquotas se a análise requerida assim necessitar e distribui-as em suportes destinados aos diferentes equipamentos do laboratório (Fig. 2).

Terminado o processo analítico, as amostras são novamente colocadas no Acceleratorp540 e, se todos os testes estiverem realizados, as amostras são arquivadas automaticamente. Caso contrário, as amostras são novamente distribuídas, tendo em conta as análises pendentes. Assim, o Acceleratorp540 permite automatizar as tarefas pré e pós-analíticas, com as suas funções de descapsulamento, avaliação da quantidade de amostra, distribuição das mesmas, realização de alíquotas (que irão ser arquivadas a - 50°) e identificação destas

por impressão de novos códigos de barras, para além de constituir um sistema automático de arquivo.



Figura 1 - Sistema automatizado de triagem - Acceleratorp540.

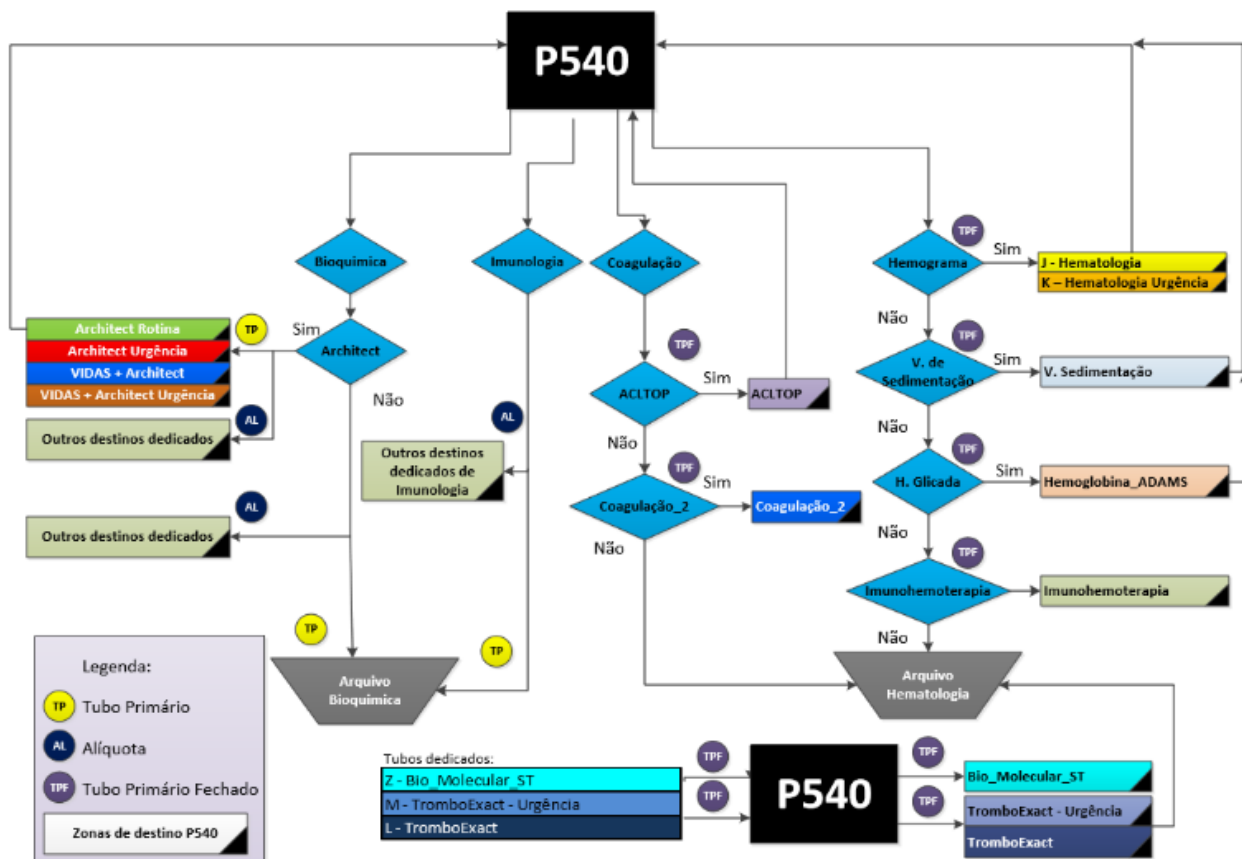


Figura 2 - Diagrama do fluxo de trabalho do Acceleratorp540.







3.3 Fase analítica

A fase analítica, apesar de estar cada vez mais automatizada, é, ainda, muito dependente de trabalho especializado no que concerne a garantia da qualidade dos resultados e, por isso, nesta fase, deve ser feita a verificação de instrumentos e reagentes, a verificação do estado de controle dos sistemas e a monitorização dos processos de análises.

Esta fase é considerada a parte mais importante de todo o processo laboratorial. Por isso, têm sido desenvolvidos métodos e equipamentos com maior sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão, e criados sistemas de controlo de qualidade, nos quais se inserem os controlos internos de qualidade e os programas de avaliação externa da qualidade, que permitem diminuir e monitorizar os erros associados à execução da técnica, e, assim, manter e/ou melhorar a qualidade dos resultados.

O SPC da ULS da Guarda dispõe de um vasto número de equipamentos automatizados, permitindo trabalhar diariamente com um elevado número de amostras. Como referido anteriormente, após a triagem das amostras pelo Acceleratorp540 estas são colocadas nos diferentes equipamentos consoante o tipo de análises solicitadas (Tabela I).

Tabela I - Equipamentos utilizados na fase analítica no setor da Bioquímica Clínica.

	Equipamento	Metodologia	Parâmetros analisados
ArchitectCi8200		Potenciometria Fotometria Quimioluminescência	Ionograma, Perfil hepático Perfil renal, Perfil pancreático Perfil lipídico, Perfil endócrino Metabolismo do ferro, Proteínas séricas Marcadores cardíacos Marcadores tumorais Drogas terapêuticas, Drogas de abuso Microbiologia serológica e antigênica Outros
Architecti2000s		Quimioluminescência	Perfil endócrino Doenças infecciosas Outros
Vidas 3		ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)	Vitamina D Procalcitonina Técnicas alternativas parav testes específicos de serologia (Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Rubéola, Toxoplasma, Citomegalovirus
Immage		Nefelometria Turbidimetria	Alfa-1-antitripsina Ceruloplasmina Apolipoproteína A e B Lipoproteína A, Haptoglobina Imunoglobulina A, G e M Cadeias Kappa e Lamda Complemento C1q, C3 e C4 Outros
Urisys 2400		Fotometria e reflectância	Sumária urina: - Cor - pH - Densidade - Bilirrubina - Urobilinogênio - Corpos cetônicos - Glucose - Proteínas - Nitritos - Leucócitos - Eritrócitos
UF-1000i		Citometria de fluxo fluorescente	Sedimento urinário: - Células epiteliais escamosas e do epitélio renal - Leucócitos - Eritrócitos - Bactérias e Leveduras gemuladas - Espermatozoides - Cilindros e Cilindros patogênicos - Cristais - Muco

3.3.1 Parâmetros bioquímicos analisados

Os parâmetros analíticos que podem ser analisados são imensos e através do seu enquadramento global e clínico é possível fazer-se o estudo de diferentes patologias.

1. Ionograma

No organismo humano os eletrólitos desempenham funções diversas que incluem a manutenção da pressão osmótica, a distribuição de água nos vários compartimentos/líquidos do organismo, a manutenção do pH, a ativação de enzimas e o auxílio na contractilidade do miocárdio e na excitabilidade neuromuscular.

No nosso organismo, os eletrólitos estão presentes em valores de concentrações muito restritos devido à presença de mecanismos de regulação muito eficientes. Porém existem diversas situações patológicas que causam um desequilíbrio eletrolítico, podendo a determinação da concentração dos eletrólitos auxiliar no seu diagnóstico.

O ionograma representa a quantificação do sódio, potássio e cloro por potenciometria indireta realizada com recurso à tecnologia de eléctrodos para iões específicos (ISEs), que consiste na medição da diferença de potencial entre os três eléctrodos correspondentes a cada ião e um eléctrodo de prata/cloreto de prata correspondente ao eléctrodo de referência. O sódio é o principal catião extracelular e é responsável pela manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico do compartimento extracelular. Um aumento nos valores do sódio pode estar relacionado com situações de hipovolémia, de desidratação, Síndrome de Cushing, em que ocorre uma sobreprodução de aldosterona, ou em situações de consumo elevado de sal sem a respetiva compensação em água. Por sua vez, situações de uso excessivo de diuréticos, vômitos, diminuição da ingestão de sódio pela dieta ou situações de acidose metabólica podem levar à hiponatremia.[4]

O potássio é o principal catião intracelular envolvido no balanço e distribuição de água no organismo. O aumento de potássio pode surgir por destruição celular, insuficiência renal, diminuição da produção de aldosterona, etc., podendo conduzir a estados de confusão mental, paralisia ou debilidade generalizada. Já a hipopotassemia, normalmente devido a um aumento da excreção de potássio, pode estar associada a diurese osmótica da hiperglicemia, ao hiperaldosteronismo, ao Síndrome de Cushing, ao uso prolongado de diuréticos e mineral corticoides, etc. A hipopotassemia conduz a estados de debilidade muscular, irritabilidade, paralisia, batimento cardíaco acelerado e, eventualmente paragem cardíaca.[4]

O cloro é o principal anião extracelular responsável pela manutenção do equilíbrio hídrico e pressão osmótica. Normalmente, os valores do cloro refletem alterações nos valores do

sódio. Caso contrário, as alterações surgem devido a desequilíbrios ácido-base. Assim, o cloro aumenta em situações de acidose metabólica associada à diarreia, doenças dos túbulos renais, hiperparatiroidismo, etc., e diminui em situações de vômitos em que há perda de ácido clorídrico na doença de Addison por deficiente produção de aldosterona, etc.[5]

O cálcio é utilizado no diagnóstico e tratamento da doença das paratiroides, de várias doenças ósseas, monitorização de pacientes com insuficiência renal e transplante renal. Aumenta no cancro, no hiperparatiroidismo e nas doenças neoplásicas do osso e diminui na insuficiência renal crónica, no hipoparatiroidismo ou em situações de má nutrição.

O fósforo encontra-se no organismo sob a forma de fosfato e é utilizado para auxiliar o diagnóstico das anormalidades das paratiroides, das doenças renais e desequilíbrios de Vitamina D. A hiperfosfatémia está associada a insuficiência renal ou a hipervitaminose D, enquanto que a hipofosfatémia pode surgir nas doenças tubulares renais ou na hipovitaminose D.

2. Perfil hepático

O fígado é o órgão mais multifuncional do organismo humano. Ele recebe e processa o sangue venoso, que chega do trato gastrointestinal, rico em nutrientes, armazena a glicose na forma de glicogénio, converte-a em aminoácidos e degrada os lípidos. Além disso, sintetiza todas as proteínas plasmáticas, à exceção das imunoglobulinas e liberta os sais biliares da biliar. Por último, o fígado converte a amónia num metabolito menos tóxico, a ureia e adiciona grupos polares a muitos fármacos, hormonas e certos metabolitos, para que possam ser excretados na urina e na biliar. Em suma, o fígado exerce funções vasculares, metabólicas, excretoras e de biotransformação.[6]

A bilirrubina é uma das principais substâncias excretadas pelo fígado, sendo o principal pigmento constituinte da biliar. A sua formação ocorre no baço em consequência da degradação dos glóbulos vermelhos, uma vez que estes ao serem destruídos causam a libertação de moléculas de hemoglobina, que são depois decompostas nos seus constituintes, nomeadamente no grupo heme. O grupo heme é convertido em biliverdina e, posteriormente, em bilirrubina que é transportada para o fígado ligada à albumina. Neste órgão, a bilirrubina é conjugada com o ácido glucorónico, ficando solúvel em água, podendo, assim, ser secretada para os canalículos biliares e posteriormente para os intestinos, nos quais através da ação da flora comensal, é convertida em urobilina, que é finalmente excretada do organismo nas fezes. Durante o processo metabólico da bilirrubina existe a formação de dois tipos de bilirrubina que se denominam bilirrubina não conjugada e

bilirrubina conjugada. A bilirrubina não conjugada corresponde à bilirrubina ligada à albumina e que é insolúvel, não podendo ser nesta forma eliminada do nosso organismo. A bilirrubina conjugada é a forma solúvel, constituída por moléculas de bilirrubina ligadas a moléculas de ácido glucorónico, que torna as moléculas de bilirrubina mais hidrofílicas.[6]

Considerando que o fígado é um órgão vital para a sobrevivência do organismo humano, a monitorização das suas funções, através da determinação periódica de parâmetros hepáticos, é um processo que permite não só identificar anormalidades na função hepática, como permite, em muitos casos, identificar o tipo e local da lesão, além de fazer o prognóstico da evolução de alguns processos patológicos.

Os principais testes de avaliação do funcionamento hepático incluem a determinação por espectrofotometria de substâncias que são libertadas como resultado da ocorrência de um dano tecidual, tais como a gama-glutamil transferase (γ GT), a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT), a fosfatase alcalina (ALP), a lactato desidrogenase (LDH), as bilirrubinas total e direta, e a amónia.

A 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 dos pâncreas.

A AST é encontrada em grandes concentrações em tecidos altamente metabólicos como o músculo cardíaco, os hepatócitos, os eritrócitos, o cérebro e o músculo-esquelético, sendo utilizado na determinação do progresso e prognóstico de pacientes com enfarte agudo do miocárdio e no diagnóstico e monitorização de doenças hepáticas.

A ALT encontra-se predominantemente no fígado e é, por isso, utilizada no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, como a cirrose hepática, hepatites e tumores hepáticos, uma vez que nestas situações aparece aumentada. É, também, utilizada na monitorização do tratamento da hepatite e da cirrose ativa pós-necrótica. Por não ser específica do fígado, pode aparecer aumentada, também, no enfarte agudo do miocárdio.

A ALP encontra-se em grandes quantidades no fígado, no epitélio do trato biliar e no osso e, por isso, é utilizada na deteção e monitorização de doenças hepáticas, biliares e ósseas. Por ser pouco específica aparece aumentada em doenças hepáticas, mas também noutras situações como hipertiroidismo, aumento do metabolismo ósseo e linfoma de Hodgkin, e diminuída em situações de desnutrição, hipotiroidismo e doença celíaca.

A LDH é uma 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 e, por isso, aparece aumentada em

inúmeras situações como cirrose hepática, anemia hemolítica, anemia megaloblástica, doenças cardiorrespiratórias e distrofia muscular, situações onde ocorrem perturbações na estrutura das células.

A Bilirrubina total é formada, como vimos, por degradação dos eritrócitos no baço, fígado e medula óssea e conjugada a nível hepático para poder ser eliminada, sendo, por isso, utilizada na avaliação da função hepática, na anemia hemolítica e na icterícia do recém-nascido. Por sua vez, a Bilirrubina direta que é a bilirrubina ligada ao ácido glucorónico é posteriormente excretada para a bilis de forma a ser eliminada pelo intestino delgado.

A Amónia é uma substância tóxica para o organismo, que resulta do catabolismo dos aminoácidos e que precisa de ser convertida pelo ciclo da ureia no seu metabolito menos tóxico, a ureia. A hiperamoniemia pode ser primária, quando ocorrem defeitos genéticos ou congénitos na formação de enzimas do ciclo da ureia, ou secundária como consequência de uma lesão hepática, como acontece na hepatite ou noutra doença hepática.

3. Perfil pancreático

O pâncreas desempenha duas funções importantes no processo digestivo, isto é, desempenha uma função endócrina, secretando insulina e glucagon na corrente sanguínea que são importantes para a regulação dos níveis plasmáticos de glicose, e funções exócrinas, pela secreção do fluido pancreático rico em enzimas digestivas (proteolíticas, amilolíticas e lipolíticas), entre outras (por exemplo, a elastase). Em certas condições patológicas, incluindo pancreatite, as enzimas pancreáticas começam a aumentar e a produção de hormonas a diminuir.[6] Sendo assim, o estudo da função pancreática faz-se através do doseamento, por espectrofotometria, das principais enzimas pancreáticas, a amilase e a lipase, e de uma forma indireta pelo doseamento, por fotometria, da glucose como resposta à produção ou não de insulina, e pelo doseamento, por quimioluminescência, do peptídeo C, que é um aminoácido importante na formação da estrutura da insulina e da pró-insulina e que, portanto, permite avaliar a atividade da secreção das células β -pancreáticas.[7]

Diagnóstico de *Diabetes Mellitus*:

O diagnóstico de diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral:

- Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl (ou $\geq 7,0$ mmol/l)
- Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l)

- Glicemia ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75 g de glicose
- Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$. [8]

O diagnóstico da Diabetes Gestacional envolve duas fases temporais distintas: glicemia em jejum na primeira consulta de vigilância pré-natal e PTGO às 24-28 semanas de gestação. [9]

- Um 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 glicose.
- Um 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 glicose às 24-28 semanas de gestação.
- Um 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.

4. Perfil renal

O rim é um órgão fundamental na manutenção da homeostase do meio interno através da produção de uma urina de composição variável. Este processo envolve a excreção renal do excesso de água, de eletrólitos e de produtos resultantes da degradação metabólica. Além disso, os rins são produtores da eritropoietina, que regula a produção dos eritrócitos, da renina, que regula o balanço do sódio pela estimulação da aldosterona, e de calcitriol, que estimula a absorção de cálcio pelo intestino e a calcificação óssea. [10]

Existem quatro principais produtos de excreção, nomeadamente, a creatinina, a ureia, o ácido úrico e a cistatina C, que por terem excreção exclusivamente renal permitem a monitorização da função do rim.

A creatinina é o produto final do metabolismo da creatina e encontra-se essencialmente no músculo-esquelético. Ela é livremente filtrada no glomérulo e secretada no túbulo proximal e só apenas uma parte da creatinina é reabsorvida. A creatinina sérica pode ser usada para diagnosticar a insuficiência renal, pois aparece aumentada, e a depuração de creatinina pode ser usada para medir a taxa de filtração glomerular (TFG). Ela está, também, aumentada em

situações de exercício físico intenso e diminuída em situações de distrofia ou redução da massa muscular.[5]

A ureia é um composto azotado intermediário do metabolismo das proteínas e dos ácidos nucleicos, que é formada no fígado e é, maioritariamente, excretada pela urina por filtração glomerular, sendo que menos de 50% sofre reabsorção. É utilizada, portanto, no diagnóstico da insuficiência renal. Concentrações baixas de ureia no soro correlaciona-se com estados de hiperidratação ou doença hepática e, por outro lado, concentrações altas implicam comprometimento da função glomerular, entre outros.[5]

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas (adenina e guanina) durante a síntese e degradação de RNA e de DNA e é utilizado na avaliação da gota, de cálculos urinários recorrentes e de defeitos tubulares renais. Também pode aparecer aumentado na anemia hemolítica, no défice de folatos ou no envenenamento por chumbo.[11]

A cistatina C é produzida por todas as células nucleadas, numa taxa constante e é praticamente toda eliminada da circulação através da filtração glomerular. A sua concentração sérica é independente da massa muscular e do sexo no intervalo de 1 a 50 anos e, por isso, surge como um marcador mais sensível para avaliação da função renal.[12]

Os três primeiros parâmetros referidos são determinados por espectrofotometria imunoenzimática, enquanto que a cistatina C é determinada com recurso a um ensaio imunoturbidimétrico.

5. Perfil lipídico

As lipoproteínas são partículas complexas de estrutura globular cuja camada externa fosfolipídica é constituída por apoproteínas e colesterol livre e o seu interior hidrofóbico constituído, principalmente, por colesterol esterificado e triglicéridos (TGL).

As lipoproteínas classificam-se segundo a sua densidade, nas quais, da menor para a maior densidade estão os quilomicra, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-C: very low density lipoprotein cholesterol), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL-C: intermediate density lipoprotein cholesterol), lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C: low density lipoprotein cholesterol) e lipoproteínas de alta densidade (HDL-C: high density lipoprotein cholesterol).[13]

As LDL-C são as lipoproteínas de maior importância do ponto de vista fisiopatológico, uma vez que são as que transportam maior percentagem de colesterol. São produtos do metabolismo das VLDL-C, que são produzidas no fígado e que são ricas em TGL, mas uma vez que os ácidos gordos são usados pelo organismo pela ação da lipoproteína lípase

endotelial, as VLDL-C vão perdendo TGL e, proporcionalmente aumenta a concentração de colesterol que se converte em LDL-C.

Algumas lipoproteínas são variáveis preditivas do risco cardiovascular, como é o caso das HDL-C que tem a função de remover o colesterol dos tecidos periféricos e transportá-lo até ao fígado para excreção e das LDL-C que pode depositar-se nos tecidos periféricos e associar-se a um risco aumentado de doenças cardiovasculares como aterosclerose, acidente vascular cerebral (AVC) ou enfarte agudo do miocárdio, para além dos valores de colesterol total.

Quanto às apolipoproteínas, existem dois tipos principais, a apolipoproteína A e apolipoproteína B, que são sintetizadas pelo fígado e intestino. A apolipoproteína A é um dos constituintes dos quilomicra e o principal componente das HDL. Ela ativa a lecitina colesterol acil-transferase, enzima que se encontra relacionada com a esterificação do colesterol livre nas partículas de HDL, funcionando como recetor do colesterol que é libertado pelas células, promovendo a sua eliminação. O doseamento da apolipoproteína A é útil para a identificação de doenças arteriocoronárias. Quanto à apolipoproteína B, existem dois tipos, a apo B-100 e a apo B-48. A apo B-100 é sintetizada no fígado e é um constituinte estrutural das VLDL, das IDL e é a proteína exclusiva presente nas LDL. A apolipoproteína B é responsável pelo transporte e pela remoção das lipoproteínas referidas anteriormente. A apo B-48 é uma proteína estrutural constituinte dos quilomicra, e é sintetizada no fígado, tendo a função de ligar as lipoproteínas remanescentes ao seu recetor, removendo-as assim da circulação. Pacientes que apresentam deficiência na ligação da apo B apresentam hipercolesterolemia e níveis elevados de LDL. A medição desta é também útil na identificação de doenças coronárias.[13]

Esta classe de compostos encontra-se associada a várias patologias, daí que a sua determinação seja uma das mais frequentes neste setor. O estudo do perfil lipídico é feita neste laboratório por espectrofotometria.

6. Perfil endócrino

No SPC da ULS da Guarda, a determinação das diferentes hormonas é feita por espectrofotometria, e por imunoensaios de micropartículas por quimioluminescência. A análise do perfil endócrino permite o estudo do funcionamento das hormonas no organismo humano e o diagnóstico de doenças das glândulas de secreção interna (glândulas endócrinas).

Hormonas sexuais

As hormonas sexuais são fundamentais para o desenvolvimento dos órgãos sexuais, bem como para a função sexual e reprodutora. São objetivo de estudo para análise do perfil hormonal sexual as hormonas: Hormona Folículo-estimulante Humana (FSH) e Hormona Luteinizante (LH), o estradiol, a progesterona, a prolactina, a gonadotropina coriónica humana (β -HCG) e a testosterona.

A FSH e LH são hormonas pertencentes à família das gonadotropinas, responsáveis por regular e estimularem o crescimento das gónadas (ovários e testículos). Estas hormonas são utilizadas no diagnóstico e monitorização de anomalias no sistema reprodutor, pois aparecem aumentadas nas mulheres na menopausa ou com hipofunção ovariana, e nos homens com hipogonadismo primário, por sua vez, aparecem diminuídas nas mulheres com hiperfunção ovariana e nos homens com hipergonadismo.[14]

O estradiol regula a função reprodutora feminina e, com a progesterona, mantém o estado de gravidez. Em mulheres não grávidas, a maior parte do estradiol é segregada pelos ovários, mas durante a gravidez é a placenta que produz a maior parte do estradiol circulante. Desta forma, 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.

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 do embrião e manutenção da gravidez. Aparece, por isso, aumentada na gravidez e níveis baixos de progesterona estão, por vezes, associados à infertilidade.

A prolactina é a hormona responsável pelo desenvolvimento e diferenciação das glândulas mamárias e o seu aumento está associado à lactação pós-parto, mas também a situações de hipogonadismo e infertilidade.

A β -HCG é produzida na placenta durante a gravidez e em mulheres não grávidas, por surgir aumentada pode esta ser produzida por tumores do trofoblasto e não trofoblásticos e tumores das células germinais.

A testosterona é, especialmente, sintetizada pelo sexo masculino (células Leydig dos testículos). Concentrações baixas de testosterona estão associadas ao hipogonadismo, a insuficiência testicular, a infertilidade ou ao hipopituitarismo.

Hormonas da tireoide

As hormonas da tireoide, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), são essenciais para o desenvolvimento somático e intelectual da criança e para a correta atividade metabólica do adulto. A função tireoideia é regulada a dois níveis, primeiro pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoideio, onde intervêm a hormona libertadora de tireotrofina (TRH), a hormona estimuladora da tireoide (TSH) e as hormonas tireoideas (T3 e T4), e pelo iodo orgânico intraglandular, necessário à síntese das hormonas da tireoide. Em termos laboratoriais, a análise do perfil tireoideio corresponde à determinação, por quimioluminescência, dos valores de T3, T4, TSH e TG (tiroglobulina). A função da hormona paratireoide é analisada tendo em conta a determinação da concentração sérica da hormona paratireoideia (PTH).[15]

A determinação das concentrações séricas das hormonas T3 e T4 permite fazer o diagnóstico diferencial de eutiroidismo, associado a valores hormonais normais, hipertireoidismo, com valores de T3 e T4 aumentados, e hipotireoidismo, com hormonas da tireoide diminuídas. Como estas hormonas exercem um efeito de feedback negativo no eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoideio, também através dos valores de TSH é possível fazer este diagnóstico diferencial, sendo que para esta hormona os valores aparecem baixos no hipertireoidismo e altos no hipotireoidismo primário. Já no hipotireoidismo central (hipofisário ou hipotalâmico) os valores de TSH aparecem em concentrações reduzidas. Esta hormona permite, ainda, fazer a monitorização da terapêutica com hormona tireoideia.

A TG é uma glicoproteína secretada pelas células foliculares da tireoide, e é estimulada pela TSH para desempenhar um papel na síntese das hormonas T3 e T4. A sua concentração é proporcional à massa tireoideia, sendo, por isso, muito útil no diagnóstico do carcinoma da tireoide folicular metastático ou recorrente após terapia, embora não seja recomendado o uso de marcadores tumorais para o diagnóstico inicial de carcinomas da tireoide.[16]

A PTH é formada na glândula paratireoideia e tem o papel de regular a concentração de cálcio ionizado no sangue e nos líquidos corporais, através do efluxo de cálcio dos ossos, da reabsorção do cálcio urinário e da ativação da vitamina D, com conseqüente aumento da reabsorção de cálcio nutricional pelo intestino.[17]

Outras hormonas de interesse clínico

- **Cortisol**: Principal hormona glucocorticoide segregada pelo córtex suprarrenal. As suas funções fisiológicas incluem a regulação do metabolismo dos carboidratos e a distribuição de eletrólitos e água. O cortisol tem também um efeito imunossupressor e anti-inflamatório. Indicador direto do estado da glândula suprarrenal e indicador indireto de hiper ou hipofunção da hipófise.
- **Insulina**: É sintetizada pelas células beta dos ilhéus 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, por sua vez, a diminuição de insulina está associada à diabetes, ao aumento da síntese de VLDL, à hipertensão e a um risco aumentado de doença cardiovascular.
- **Sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S)**: Androgénio suprarrenal mais abundante, e que também funciona como neuroesteróide, produzido pelo córtex suprarrenal. Indicador da produção suprarrenal de androgénio. As concentrações séricas declinam com a idade e podem ser utilizadas como fator de prognóstico em doenças graves e na progressão do cancro da mama. Aparece aumentado no tumor suprarrenal, na hiperplasia suprarrenal congénita e na síndrome do ovário poliquístico.

7. Metabolismo do ferro

O ferro é um ião presente em baixas quantidades no organismo humano, estando distribuído maioritariamente nos eritrócitos e nos seus precursores medulares como parte constituinte da hemoglobina, encontrando-se ligado a várias enzimas, como cofator, e estando armazenado na forma de ferritina e hemossiderina.

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 ferro é um dos constituintes da hemoglobina e está relacionado com o transporte do oxigénio até aos tecidos, através dos eritrócitos. A determinação deste analito é útil no

diagnóstico e na monitorização de anemias ferropénicas e em situações de hemocromatose, sendo que deverá ser acompanhada pelo estudo da ferritina e transferrina. Aparece diminuído na anemia ferropénica, por perda crónica de sangue ou por absorção inadequada de ferro. Já o seu aumento está associado a anemias sideroblásticas, anemias hemolíticas, hemocromatose e talassémias.

A ferritina é uma proteína de armazenamento do ferro no organismo e, por isso, é utilizada no diagnóstico e monitorização da anemia ferropénica e sideroblástica, onde aparece diminuída, bem como na hemocromatose, onde esta aparece aumentada. Por ser uma proteína de fase aguda, a ferritina pode surgir aumentada em processos inflamatórios agudos.[18]

A transferrina é a principal proteína transportadora de ferro no soro e, por isso, aumenta nas anemias por depleção de ferro. Contudo, apresenta-se diminuída na hemocromatose, etc.

O Ácido fólico e a vitamina B12 são utilizados no diagnóstico e monitorização de anemias megaloblásticas, uma vez que, a deficiência de ácido fólico e de vitamina B12 conduz a um defeito na síntese de DNA que previne a divisão celular com a produção de grandes eritrócitos.[19]

8. Proteínas séricas

O plasma humano contém mais de 500 proteínas identificáveis. A avaliação da concentração de determinadas proteínas séricas tem considerável valor diagnóstico em desordens agudas e crónicas. Entre elas destacamos a albumina, o valor de proteínas totais e a proteína C-reativa (PCR), determinadas no SPC da ULS da Guarda por fotometria, através de testes colorimétricos.

A Albumina é a proteína presente em maior concentração na corrente sanguínea, sendo utilizada como marcador de alteração do metabolismo proteico e no diagnóstico e na monitorização de doenças inflamatórias crónicas e renais. Aparece aumentada em situações de hipovolémia como na desidratação intensa e diminuída nas doenças hepáticas (diminuição da função de síntese) e em situações de aumento do catabolismo ou baixa absorção.

A determinação das proteínas totais, que incluem a albumina e as globulinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ , é utilizada em diversos distúrbios hepáticos, renais, metabólicos, nutricionais e relacionados com a medula óssea. São exemplos de situações de hiperproteinémia o mieloma múltiplo, a cirrose hepática e inúmeras situações inflamatórias, e situações de hipoproteinémia, a gravidez, hepatopatias e glomerulonefrite.

Por sua vez, a PCR é uma proteína de fase aguda sintetizada a nível hepático, aparecendo, por isso, aumentada em distúrbios inflamatórios, lesão tecidual, infeções e situações de stress intenso.

Outras proteínas, de grande interesse clínico, e que passo a descrever a seguir, 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, no fígado, pelos macrófagos, no pulmão e no pâncreas. 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 I-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 do corpo de serem danificados pela enzima elastase, presente nos neutrófilos, monócitos e eosinófilos, quando estas entram em ação aquando de uma inflamação em alguma parte do corpo. As suas pequenas dimensões permitem-lhe que se difunda nos fluidos corporais.

A ceruloplasmina é uma glicoproteína, produzida pelo fígado, responsável pelo transporte de 80 a 95% do cobre plasmático. É uma 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, que é considerada um fator de risco independente para a doença coronária, cerebrovascular, vascular periférica e tromboembolismo venoso. A sua função fisiológica não é ainda conhecida, no entanto parece possuir uma função no sistema de coagulação, pois apresenta grande homologia com o plasminogénio e com o fator ativador do plasminogénio tecidual. A lipoproteína A compete com o plasminogénio pelas zonas de ligação, levando a uma fibrinólise reduzida. 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 a hemoglobina. 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 e 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 que 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 infeções.
- 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 fluídos intracelulares é baixa devido às suas grandes dimensões. Sendo que esta imunoglobulina participa na resposta imunitária primária e esta característica permite perceber se a infeção é aguda ou crónica.

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 assim 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 e que promovem inflamação. Assim, são úteis no diagnóstico de

patologias imunológicas (deficiências dos componentes do complemento), processos inflamatórios e necróticos, tais como:

- Inflamações crônicas não infecciosas
- Doenças sistêmicas
- Distúrbios necróticos
- Glomerulonefrite
- Pneumonia
- Meningite bacteriana
- Septicemia

9. Marcadores cardíacos

Os biomarcadores cardíacos são um elemento fundamental para a abordagem diagnóstica das síndromes coronárias agudas, uma vez que, a avaliação clínica é frequentemente limitada por sintomas atípicos e, por vezes, o eletrocardiograma inicial não permite o diagnóstico por si só. O conhecimento do padrão de subida destas substâncias no sangue periférico e dos seus valores de referência é fundamental para uma utilização adequada 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.[20] No laboratório da ULS da Guarda a determinação destes marcadores é feita com recurso a imunoensaios de micropartículas por quimioluminescência. A creatinina-quinase (CK) é uma enzima inespecífica do músculo cardíaco e que é utilizada no diagnóstico e monitorização de doenças associadas ao músculo cardíaco, músculo-esquelético, sistema nervoso central e tiroide. Por sua vez, a creatinina-quinase - MB (CK-MB) é uma isoenzima da CK específica do músculo cardíaco e, por isso, o aparecimento da CK-MB no soro, na ausência de traumatismo muscular grave, pode indicar danos cardíacos e, por conseguinte, enfarte agudo do miocárdio.

O BNP é sintetizado e libertado na corrente sanguínea em resposta a uma sobrecarga de volume ventricular ou a patologias causadoras de dilatação ventricular, para controlar a homeostasia dos fluidos e eletrólitos. Níveis plasmáticos de BNP fornecem informações úteis para o diagnóstico e tratamento da disfunção do ventrículo esquerdo e insuficiência cardíaca, bem como para avaliar a gravidade da insuficiência cardíaca.[20]

A mioglobina é a proteína de ligação do oxigênio do músculo cardíaco e do músculo-esquelético e a sua determinação fornece um índice de lesão do miocárdio, sendo utilizado para avaliação inicial de pacientes com suspeita de enfarte agudo do miocárdio.

A troponina T (TnT) é a fração estrutural da troponina que se liga à tropomiosina, apresentando grande especificidade para o músculo cardíaco. A sua liberação e elevação na circulação ocorre 4 a 6 horas após lesão cardíaca.

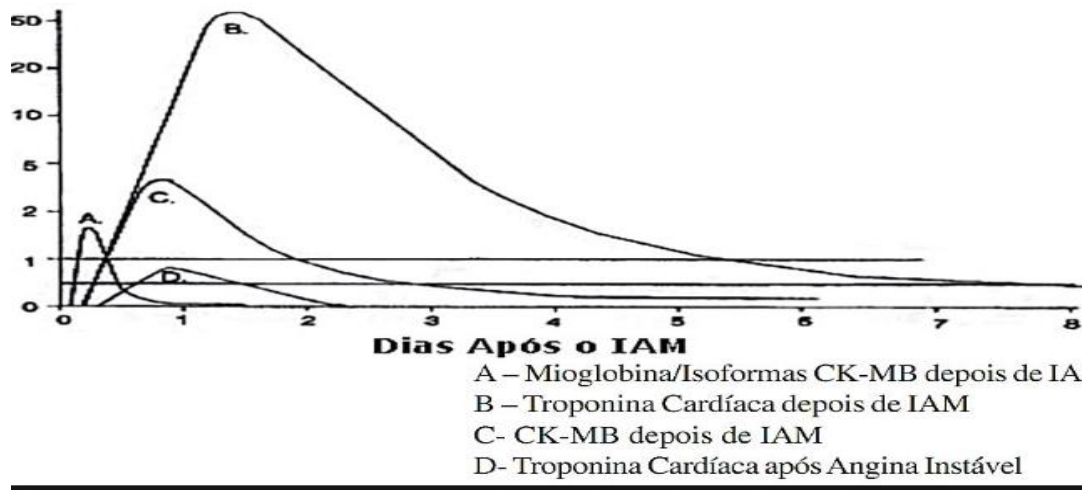


Figura 3 - Curvas de aparecimento dos biomarcadores cardíacos.

10. Marcadores tumorais

Marcadores tumorais são substâncias produzidas por células neoplásicas ou por células normais do organismo em resposta ao cancro, que podem ser encontrados em níveis muito elevados em doenças oncológicas, ajudando assim na monitorização destas doenças. São determinados, neste serviço, com recurso a imunoensaios de micropartículas por quimioluminescência. Os marcadores tumorais mais utilizados na clínica são a alfa-fetoproteína, o antígeno 125 do cancro (CA 125), o antígeno total específico da próstata (PSA Total), o antígeno carboidrato (CA 19.9), o antígeno carcinoembrionário (CEA), o antígeno 15.3 do cancro (CA 15.3) e o marcador CYFRA 21.1.

A alfa-fetoproteína é uma proteína fetal sintetizada pelo fígado, saco vitelino e trato gastrointestinal, utilizada como marcador de defeitos do tubo neural no feto em desenvolvimento, do carcinoma hepatocelular e do carcinoma das células germinativas.

O antígeno CA 125 é útil na avaliação da terapia e monitorização do cancro dos ovários, bem como de neoplasias do pulmão, mama, pâncreas e colón.

O antígeno PSA Total, como o próprio nome indica, é uma glicoproteína sintetizada na glândula da próstata sendo indicativa de patologias na mesma.

O antígeno CA 19.9 permite a monitorização do tratamento e prognóstico do cancro do pâncreas, bem como do cancro nos ductos biliares, do colón e do reto.

O antígeno CEA é uma glicoproteína pertencente ao grupo dos antígenos carcino-fetais que são produzidos durante o período embrionário. Encontra-se sobretudo no trato gastrointestinal e no soro do feto. Também é indicativo de outros tumores, como é o caso do cancro do pulmão, cancro da tiroide e cancro do colon.

O antígeno CA 15.3 é um marcador específico do cancro da mama, bem como do estômago e ovário.

O antígeno CYFRA 21.1 é um antígeno de alta sensibilidade para o carcinoma de células escamosas, sendo um fator de mau prognóstico no carcinoma do pulmão.

11. Monitorização de drogas terapêuticas

A monitorização de drogas terapêuticas é a medida do nível sérico de um fármaco de forma a garantir uma concentração dentro do intervalo terapêutico, ou seja, dentro do intervalo de concentrações no qual se sabe que o fármaco é eficaz e não causa efeitos tóxicos no paciente, sendo, por isso, necessário aplicar o conceito do valor de vale e valor de pico e sua correlação com a atividade farmacológica para cada fármaco, de forma a minimizar os efeitos tóxicos e o insucesso da terapêutica. Defende-se, atualmente, que a monitorização sérica da terapêutica por si só não é suficiente para um correto acompanhamento do doente e que é necessário fazer em simultâneo o controlo clínico de inúmeros biomarcadores de previsão que permitem verificar a ação tóxica do fármaco ao nível dos órgãos. Esta monitorização é importante essencialmente em fármacos que apresentam doses terapêuticas estreitas.[21] No SPC da ULS da Guarda faz-se a monitorização por fotometria e por imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência, os seguintes fármacos:

- Carbamazepina - antiepilético
- Valproato de sódio - antiepilético
- Lítio - antidepressivo
- Antidepressivos tricíclicos
- Digoxina - glicosídeo cardíaco
- Teofilina - broncodilatador
- Vancomicina - antibiótico
- Gentamicina - antibiótico
- Tobramicina - antibiótico

- Amicacina - antibiótico
- Paracetamol - analgésico
- Salicilatos - anti-inflamatório

12. Controlo de drogas de abuso

Entende-se por droga de abuso: qualquer substância que modifica, aumenta, inibe ou reforça as funções fisiológicas, psicológicas ou imunológicas do organismo de maneira transitória ou permanente. Inúmeras drogas de abuso podem ser determinadas, neste caso por fotometria com recurso a ensaios imunoenzimáticos:

- Canabinóides (Marijuana e/ou haxixe): Produzem efeitos alucinogénios e outros efeitos biológicos.
- Anfetamina/metanfetamina: Em doses elevadas causam excitação no sistema nervoso central, euforia, agilidade, apetite reduzido e uma sensação de energia e potência elevadas.
- Metadona: Narcótico utilizado para diminuir dores excessivas, sendo também utilizada no tratamento do vício da heroína.
- Fenciclidina (PCP): Conhecido como “pó de anjo”, produz sintomas clínicos que vão desde a confusão, desorientação, estupor, 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, usados 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. O seu 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.

13. Outros analitos sanguíneos

Um conjunto de outros analitos são, também, analisados devido à sua importância clínica.

A adenosina desaminase (ADA) é a enzima conversora da adenosina em inosina, uma enzima envolvida no metabolismo das purinas, e está distribuída em todo o organismo apresentando

um papel importante no sistema imune, pois possui alta atividade nos linfócitos T e macrófagos. Útil no diagnóstico da tuberculose, da mononucleose infecciosa, da febre tifoide, da sarcoidose crônica ativa e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), situações em que esta enzima aparece aumentada.

A enzima conversora da angiotensina (SACE) é produzida principalmente nas células epiteliais pulmonares, onde converte angiotensina I em angiotensina II que, por sua vez, estimula a glândula adrenal para a produção de aldosterona. Muito útil no diagnóstico de doenças vasculares, no diagnóstico e monitorização de sarcoidose, como auxiliar no diagnóstico de lepra, ou na doença de Gaucher.

O lactato é um dos produtos finais da glicólise anaeróbia, que ocorre em tecidos onde há hipoxia, o que pode acontecer em doenças como pneumonia e insuficiência cardíaca congestiva.

A homocisteína é um aminoácido produzida pela desmetilação intracelular da metionina. A hiperhomocisteinémia é um estabelecido fator de risco de trombose venosa e arterial e pode ser exacerbada pela deficiência de cofatores do metabolismo da metionina como a vitamina B6, a vitamina B12 e o ácido fólico. A hiperhomocisteinémia induz uma disfunção endotelial (com perda das propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas dependentes do endotélio) e proliferação do músculo liso vascular, ambos processos-chave nos modelos atuais de aterogênese e trombose.

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel, obtida a partir do colesterol, podendo ser sintetizada na pele quando esta é exposta a radiação ultravioleta B. Tem funções ao nível do desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, assim como na manutenção da hemóstase normal do cálcio e do fósforo. A vitamina D estimula o papel dos osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea através destes, aquando da libertação de cálcio, de modo a manter os níveis extracelulares de cálcio. O doseamento de vitamina D é utilizado para avaliar potenciais insuficiências desta vitamina.

3.3.2 Análise de Urinas

A urianálise é uma das provas mais comuns nos laboratórios de análises clínicas, sendo muito útil no diagnóstico de doenças renais e do trato urinário. Hoje em dia existem soluções completas de análises bioquímicas e do sedimento urinário que permitem trabalhar de forma automatizada.

➤ Sumária de urina - Urina tipo II

A análise sumária de urina é feita por fotometria de refletância num aparelho totalmente automatizado (Urisys 2400) para medições semi-quantitativas *in vitro* de tiras de teste de urina. Permite a determinação semi-quantitativa de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue na urina - um feixe de luz incide sobre a banda reativa e a luz é refletida com uma intensidade que depende da cor da banda. Os resultados dos testes baseiam-se na leitura da intensidade da luz refletida. Além disso, permite a determinação da densidade específica (por refratometria), cor e aspeto de cada amostra (por turbidimetria).

➤ Sedimento urinário

A análise do sedimento urinário é feita através de um equipamento totalmente automatizado (UF-1000i) para quantificação do sedimento urinário. Utiliza a tecnologia de citometria de fluxo fluorescente em dois canais de medição dedicados para a contagem de partículas de urina e bactérias. Esta tecnologia permite diferenciar de forma precisa partículas de uma amostra heterogénea através da projeção de um feixe de luz sobre as partículas presentes que foram marcadas previamente com fluorocromos e consequente medição da luz dispersa e da fluorescência característica de cada partícula.

O UF-1000i permite, desta forma, quantificar o número de células epiteliais escamosas, células do epitélio renal, leucócitos, eritrócitos, bactérias, leveduras gemuladas, espermatozoides, cilindros, cilindros patológicos, cristais e muco.

3.4 Fase pós-analítica

A fase pós-analítica é a fase posterior ao processamento de cada amostra, sendo que a obtenção dos resultados deve ter em consideração o diagnóstico clínico, assim como, análises anteriores do paciente, caso existam. Após uma observação correta dos dados, e caso não se suspeite de nenhum erro, procede-se à validação dos resultados anteriormente obtidos. Sempre que haja dúvidas relativamente aos resultados obtidos deve-se repetir as análises.

Todo o processo de leitura e validação de resultados é realizado no *software* do Hospital Sousa Martins, sendo da responsabilidade dos farmacêuticos especialistas do serviço.

4 Microbiologia aplicada à clínica

A Microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos - seres vivos de dimensões microscópicas que existem como células únicas ou como grupos de células. Os microrganismos estão divididos em quatro grupos: bactérias, vírus, fungos e parasitas; cada um com o seu próprio nível de complexidade.

A Microbiologia Médica é uma ciência cada vez mais complexa, pois são milhares os microrganismos que vivem dentro de nós, sobre nós e em torno de nós; e são centenas aqueles que causam sérias doenças em humanos. Por outro lado, é uma ciência dinâmica, pois os microrganismos são seres vivos com capacidade de adaptação o que faz com que antibióticos eficientes no passado sejam agora impotentes contra alguns dos mais comuns patógenos.

Neste Serviço, o estudo de Micobactérias é feito num setor isolado (setor das Micobactérias) e de acordo com procedimentos próprios.

4.1 Organização e equipamentos

Existem na secção de Microbiologiaos seguintes equipamentos:

- BacT/ALERT® 3D da Biomerieux® - sistema de deteção automatizada em hemoculturas;
- VITEK® 2 Compact da Biomerieux® - sistema automatizado de identificação bacteriana e antibiograma;
- PolyStainer® - aparelho de corar lâminas - utilizado na coloração de Gram (e Auramina).

No que diz respeito à organização, as amostras recebidas são separadas e processadas de acordo com os protocolos para cada produto biológico.

4.2 Fase pré-analítica

O laboratório de microbiologia no contexto das análises clínicas desempenha um papel de extrema importância no diagnóstico e controle das doenças infecciosas. A fase pré-analítica que corresponde ao período entre a requisição do exame pelo clínico até à realização do exame laboratorial (fase analítica) condiciona a capacidade do laboratório de realizar essas

funções. É, por isso, importante que todas as etapas desta fase sejam executadas com o máximo de qualidade.

Muitos dos testes realizados no laboratório de microbiologia requerem o isolamento de microrganismos viáveis, o que significa que a amostra representativa do local infetado com o possível agente patogénico deve ser colhida, entregue rapidamente ao laboratório num sistema de transporte adequado e semeada em meios de cultura que permitam o crescimento desse mesmo agente patogénico. Por outro lado, devem ser tomadas medidas que mantenham a amostra livre de contaminação por microrganismos clinicamente insignificantes que estão presentes no ambiente ou fazem parte da microbiota normal do doente.

4.3 Fase analítica – Métodos de diagnóstico

O diagnóstico microbiológico é o conjunto de procedimentos e técnicas complementares utilizados para estabelecer a etiologia do agente responsável por uma doença infecciosa.

O nosso organismo é colonizado por milhares de microrganismos. Esta população de microrganismos é numerosa e diversificada e coloniza a pele, as mucosas e os aparelhos respiratório, intestinal, reprodutor e urinário (Tabela II).[22]

A maioria dos microrganismos encontrados na flora comensal são bactérias. A relação que estes microrganismos estabelecem com o hospedeiro é chamada de comensalismo, ou seja, uma das espécies tira partido desta interação, não afetando a outra espécie em grau considerável, por outras palavras, a espécie hospedeira não é significativamente prejudicada ou favorecida. O comensalismo representa um tipo de relação positiva, levando ao desenvolvimento de interações benéficas. Existem também os patogénicos oportunistas, que causam infeções caso haja alterações da flora residente, e os patogénicos obrigatórios, cuja presença origina sempre danos no hospedeiro.

O conhecimento da flora comensal é muito importante na análise dos produtos biológicos que chegam ao laboratório, para que não sejam obtidos falsos resultados positivos e para que os verdadeiros agentes patogénicos possam ser identificados devidamente.

Tabela II - Distribuição dos principais microrganismos da flora comensal.

Região	Flora Comensal	Agentes potencialmente patogênicos
Pele	- <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa - <i>Propionibacterium</i> spp. - <i>Corynebacterium</i> spp.	- <i>S. epidermidis</i> - <i>S. aureus</i>
Olhos (conjuntiva)	- <i>Streptococcus viridans</i> - <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa - <i>Difteroides</i> spp.	- <i>S. pneumoniae</i> - <i>S. aureus</i> - <i>H. influenzae</i> - <i>N. meningitidis</i>
Vias aéreas superiores (Fossas nasais e nasofaringe)	- <i>Streptococcus viridans</i> - <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo - <i>Corynebacterium</i> spp.	- <i>S. pneumoniae</i> - <i>S. aureus</i> - <i>H. influenzae</i>
Aparelho intestinal (intestino grosso e delgado)	- <i>Lactobacillus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> spp. - Anaeróbios - <i>Enterobactereaceas</i> spp.	- <i>Salmonella</i> spp. - <i>Campylobacter</i> spp. - <i>E. coli</i> - <i>Shigella</i> spp. - <i>Yersinia</i> spp.
Aparelho urinário (Uretra)	- <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Difteroides</i> spp. - <i>Lactobacillus</i> spp.	- <i>Entecococcus</i> spp. - <i>Enterobactereaceas</i> spp.
Aparelho reprodutor (Vagina)	- <i>Lactobacillus</i> spp. - <i>Streptococcus</i> spp. - <i>Bacteróides</i> spp. - <i>Difteroides</i> spp.	- <i>Trichomonas vaginalis</i> - <i>C. albicans</i> - <i>C. glabrata</i> - <i>N. gonorrhoeae</i>

4.3.1 Exames microscópicos diretos – técnicas de coloração

Por ser de fácil execução, o exame microscópico direto permite, de forma rápida, através das características morfológicas dos microrganismos, fazer um diagnóstico presuntivo que pode ser dado ao clínico como provisório até ser obtido um diagnóstico final. Pode ser feito a fresco, permitindo avaliar de uma forma rápida a presença de bactérias, fungos, parasitas, células epiteliais, leucócitos, etc, após coloração de Leishman que permite avaliar a qualidade das amostras, visualização de células epiteliais, leucócitos e ainda alguns parasitas, após coloração pelo método de Gram para poder ser avaliada a morfologia e a reação tintorial dos microrganismos presentes nas mesmas, ou após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen para bactérias que não coram bem pelo método de Gram, como é o caso das bactérias do género *Mycobacterium*, *Nocardia* entre outros.

4.3.2 Exame cultural – meios de cultura

Os meios inicialmente semeados dependem do tipo da amostra e do tipo de organismo classicamente associado a patogénese/doença da nossa amostra. Na maior parte das amostras, é essencial que nas primoculturas haja um crescimento generalizado de todos os microrganismos presentes, sendo, por isso, utilizados, principalmente, meios de enriquecimento (Tabela III). Este tipo de meio é suplementado com nutrientes que permite o crescimento de microrganismos mais fastidiosos, para além dos pouco exigentes. Estas culturas são, na sua maioria, observadas após 24 horas de incubação a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ para que possa ser feita uma análise macroscópica das colónias que cresceram. São então avaliados parâmetros como o predomínio, a cor e morfologia das colónias (forma, rebordo, superfície), presença ou não de hemólise (se aplicável), etc. A interpretação das primoculturas, tendo em conta o contexto clínico, o tipo de produto, o que pode ser patogénico e o que é comensal, permite a repicagem da(s) bactéria(s) de interesse (o que se pensa ter significado clínico) para meios seletivos e/ou diferenciais de maneira a obtermos colónias isoladas para que as técnicas de identificação e de determinação de suscetibilidades a antibióticos possam ser aplicadas.

Estes meios seletivos (Tabela III) favorecem o crescimento de determinado grupo de bactérias em detrimento de outras devido à presença de fatores essenciais ao crescimento do grupo de bactérias que se pretende isolar e/ou de antibióticos que suprimem o crescimento dos restantes grupos. Quanto aos meios diferenciais, são úteis na medida em que evidenciam visualmente certas características bioquímicas que permitem diferenciar grupos de bactérias.

Em suma, depois de escolhidos, tendo em conta o microrganismo que se espera encontrar como patogénico, os meios de cultura são inoculados com um determinado inóculo do produto biológico, semeados através da técnica de sementeira apropriada, e colocados a incubar em estufa sob condições específicas de temperatura, O_2 e CO_2 . Na tabela III estão descritos os meios de cultura usados para o crescimento, isolamento, identificação, quantificação e conservação de microrganismos.

Tabela III - Classificação dos meios de cultura.

Meios de Cultura	Descrição
Não Seletivos	<ul style="list-style-type: none">• Sem inibidores de crescimento, com nutrientes;• Permitem o crescimento de qualquer microrganismo encontrado em produtos biológicos.
Seletivos	<ul style="list-style-type: none">• Com antibióticos, antifúngicos ou substâncias químicas;• Permitem o crescimento de alguns microrganismos em detrimento de outros, cujo crescimento é inibido.
Diferenciais	<ul style="list-style-type: none">• Com substâncias químicas ou corantes;• Permitem distinguir grupos de microrganismos presentes no mesmo inóculo.
Enriquecimento	<ul style="list-style-type: none">• Com nutrientes;• Permitem a multiplicação dos microrganismos de interesse que se encontram no produto biológico de baixo inóculo.
Transporte	<ul style="list-style-type: none">• Mantêm a viabilidade dos microrganismos sem que estes se multipliquem.
Identificação	<ul style="list-style-type: none">• Evidenciam características bioquímicas de determinadas espécies.

Os meios de cultura podem ser sólidos, semissólidos e líquidos (Tabela IV). Os meios sólidos permitem a observação de colônias de bactérias ou fungos que se desenvolvem à superfície ou no interior da gelose, com aspetos e cores diferentes que auxiliam na sua identificação. São úteis para a obtenção de culturas puras e observação de reações bioquímicas específicas. Os meios de cultura semissólidos são usados em estudos de mobilidade bacteriana e para o crescimento de bactérias anaeróbias. Os meios de cultura líquidos são usados para o enriquecimento de produtos biológicos de baixo inóculo. No laboratório são utilizados meios de cultura sólidos e líquidos (Tabela IV).



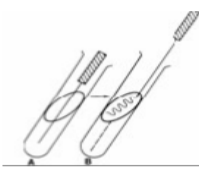
Tabela IV - Meios de cultura sólidos utilizados (no SPC da ULS da Guarda todos pertencem à casa comercial bioMérieux).

	Meios de cultura	Características
Meios sólidos	<u>Gelose de sangue (GS)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo; • Permite o isolamento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos; • Possui sangue de carneiro que permite a expressão de hemólise (α, β, ou γ), devido à presença de fator X.
	<u>Gelose de chocolate (GC)</u> PolyViteX	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo; • Permite o isolamento de bactérias fastidiosas, como <i>Neisseria spp.</i>, <i>Haemophilus spp.</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>; • Composto por uma base nutritiva enriquecida em fatores X (hemina) e V (NAD) provenientes da hemoglobina, e PolyViteX; • Para crescimento de microrganismos fastidiosos, este meio deve ser incubado numa estufa de atmosfera enriquecida em CO₂.
	<u>Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio diferencial e não seletivo; • Utilizado no isolamento de microrganismos presentes na urina; • Permite a diferenciação entre microrganismos fermentadores da lactose (colónias amarelas), dos microrganismos não fermentadores (colónias azuis, verdes ou incolores); • Limita a invasão (swarming) pelo <i>Proteus spp.</i> pela sua deficiência em eletrólitos.
	<u>Gelose MacConkey (MCK)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo diferencial; • Permite isolamento de bacilos Gram negativo (<i>Enterobacteriaceae spp.</i>, <i>Pseudomonas spp.</i>, entre outros); • Os sais biliares e o cristal violeta inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivo; • A fermentação da lactose é evidenciada pela viragem do vermelho neutro (microrganismos fermentadores da lactose originam colónias rosas ou vermelhas; microrganismos não fermentadores da lactose originam colónias incolores ou ligeiramente bege).
	<u>Gelose Manitol Salgado (MSA)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo diferencial; • Permite o isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i>, e a identificação presuntiva de <i>S. aureus</i>; • A elevada concentração de cloreto de sódio (NaCl) inibe a maior parte dos Gram negativo permitindo o isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i>; • A fermentação do manitol, evidenciada pelo vermelho de fenol, permite a identificação presuntiva de <i>S. aureus</i> (colónias amarelas).
	<u>Gelose Staphylococcus aureus Meticilina Resistentes (MRSA)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo diferencial e de identificação (cromogénico); • Permite o isolamento e identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina, na presença de cefoxitina.
	<u>Gelose Xilose-Lisina-Desoxicolato de sódio (XLD)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo diferencial; • Permite o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> a partir de fezes; • As bactérias que produzem H₂S originam colónias com centro negro; • A presença de colónias rosas ou vermelhas com ou sem centro negro (colónias características) representa uma forte presunção de <i>Salmonella</i> ou de <i>Shigella</i>.
	<u>Yersinia agar (YER)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio de isolamento seletivo e diferencial; • A presença de manitol e vermelho neutro permite a diferenciação da <i>Yersinia spp.</i> pela coloração das colónias (rosa escuro e vermelhas).
	<u>Campyloset (CAM)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo para o isolamento de <i>Campylobacter spp.</i> a partir de fezes; • O meio é enriquecido com sangue de carneiro que facilita o crescimento destes microrganismos, e possui antibióticos e antifúngicos que inibem a maior parte dos contaminantes bacterianos e fúngicos; • A incubação deste meio de cultura deve ser feita em atmosfera de microaerofilia.
<u>Granada (GRAN)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo diferencial; • Permite o isolamento de estreptococos do grupo - utilizado para sementeiras de zaragoas vaginais e retais; • O crescimento de estreptococos do grupo B é evidenciado pela presença de colónias 	

		cor de laranja.
	<u>Gelose chocolate</u> <u>VCAT</u> <u>(VCA)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo para o isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> em colheitas polimicrobianas. • A seletividade é obtida por associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir a maioria das outras bactérias e leveduras que não as espécies pesquisadas.
	<u>Gelose D-cocosele</u> <u>(DCO)</u> (Bílis Esculina Agar)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo e diferencial; • Permite o isolamento de enterococos a partir de colheitas polimicrobianas; • A hidrólise da esculina dos enterococos provoca o aparecimento de um halo negro à volta das colónias; • A seletividade do meio em relação às bactérias Gram negativas é assegurada pela azida sódica. A bílis inibe algumas bactérias Gram positivas, excetuando os enterococos.
	<u>Gardnerella</u> <u>(GAR)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo destinado à deteção de <i>Gardnerella vaginalis</i> a partir de colheitas genitais; • A presença de sangue humano facilita o crescimento da espécie procurada e permite a obtenção de uma β-hemólise à volta das colónias; • Os antibióticos presentes no meio inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos bem como das leveduras.
	<u>Sabouraud</u> <u>Cloranfenicol</u> <u>Gentamicina</u> <u>(SGC)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio de isolamento de fungos e leveduras; • Os fungos e as leveduras são nutridos por glucose e a presença de cloranfenicol e gentamicina inibe o crescimento bacteriano.
	<u>Candida (CAN)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo diferencial; • Permite o isolamento de leveduras e a identificação da espécie <i>C. albicans</i> e a diferenciação presuntiva de um conjunto de estirpes que agrupa <i>C. tropicalis</i>, <i>C. lusitanae</i> e <i>C. kefyr</i>; • A hidrólise específica de um substrato cromogénico de hexosaminidase na presença de um indutor da enzima (patente da bioMerieux) leva à coloração azul das colónias de <i>C. albicans</i>; • A mistura de inibidores permite inibir o crescimento da maior parte das bactérias.
	<u>Mueller Hinton</u> <u>Mueller Hinton</u> <u>sangue</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo; • Permite a realização de antibiogramas de bactérias não fastidiosas por difusão; • Adicionado de sangue de carneiro, é utilizado para o mesmo fim, mas para bactérias que requerem sangue para o seu crescimento (<i>Streptococcus spp.</i>)
Meios líquidos	<u>Caldo Trypticase</u> <u>Soja</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Composto por uma mistura de peptonas o que permite o crescimento da maioria dos microrganismos não exigentes (bactérias e fungos).
	<u>Caldo Coração-cérebro (BHI)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Composto por uma base nutritiva enriquecida, está especificamente adaptado ao crescimento dos microrganismos aeróbios exigentes.
	<u>Caldo GN</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizado para o enriquecimento seletivo de organismos gram-negativos, especialmente a <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>; • A alta concentração de Manitol acima da concentração de Dextrose favorece o crescimento de <i>Salmonella spp.</i> fermentadora de manitol e <i>Shigella spp.</i> e desfavorece espécies que não fermentam manitol, como <i>Proteus</i>.
	<u>Caldo Todd</u> <u>Hewitt +</u> <u>Antibióticos</u> <u>(TODD H-T)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • É um caldo de enriquecimento seletivo destinado à deteção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida; • Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos Gram negativos; • Após a etapa de enriquecimento, o caldo Todd-Hewitt + Antibióticos deve ser repicado em meios destinados à deteção dos estreptococos.
	<u>Hemoculturas</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo de enriquecimento; • Permite a multiplicação de bactérias fastidiosas e não fastidiosas, bem como de fungos leveduriformes, em amostras de sangue.

A inoculação dos meios de cultura pode ser realizada através de vários métodos, conforme descrito na Tabela V e requer o uso de ansas (de níquel ou de plástico descartáveis). O método dos 4 quadrantes (Tabela V) consiste no espalhamento do inóculo inicial num quadrante da gelose, para depois esgotar o material ao longo dos restantes três quadrantes através de estrias largas, de forma a obter colónias isoladas. O inóculo inicial pode ser colocado na gelose através de uma zaragatoa ou da própria ansa. Para a contagem semi-quantitativa de colónias é utilizado outro método, no qual são utilizadas ansas calibradas para efetuar uma estria ao longo de um raio da gelose, e depois o inóculo é espalhado através de estrias apertadas (perpendiculares à primeira) em toda a superfície da gelose.

Tabela V - Técnicas de sementeira usadas no laboratório de Microbiologia.

	Técnicas de sementeira	Procedimento
Sementeiras em meios sólidos em placa [23]	<u>Esgotamento por quadrantes</u> 	<p>A técnica de sementeira de esgotamento por quadrantes permite obter/isolar colónias puras (populações resultantes da multiplicação de uma única célula inicial).</p> <p>Esta técnica baseia-se no pressuposto que cada espécie bacteriana apresenta um tipo particular de colónias num determinado meio de cultura, e que uma colónia descende de uma única célula inicial.</p> <p>O procedimento consiste em depositar uma ansa (10µL) de inóculo sobre o meio de cultura junto à periferia e, a partir daí, traçar sobre a superfície do meio uma série de estrias paralelas, de forma leve para não ferir o meio.</p> <p>O inóculo vai-se esgotando de modo que nas últimas estrias o inóculo seja mínimo, podendo nessas estrias obter-se colónia isoladas.</p>
	<u>Esgotamento quantitativo</u> 	<p>A técnica de sementeira de esgotamento quantitativo visa a posterior contagem de colónias (UFC's), baseando-se nos mesmos pressupostos que a técnica de esgotamento por quadrantes.</p> <p>O procedimento consiste fazer um traço longitudinal no meio de cultura com uma ansa de 1µL, para o esgotamento do inóculo.</p> <p>Posteriormente, partindo do mesmo ponto de partida, fazer estrias paralelas entre si e perpendiculares ao traço inicial, até ao fim da placa.</p>
	<u>Rolamento em placa</u>	<p>A sementeira por rolamento em placa é uma técnica semi-quantitativa, destinada à pesquisa de microrganismos em cateteres centrais, periféricos, arteriais, umbilicais, de alimentação parentérica, entre outros.</p> <p>O cateter não deve ter um comprimento superior a 5 cm e deve ser colocado sobre o meio de cultura a inocular. A técnica baseia-se em fazer rodar o cateter sobre toda a área do meio, com o auxílio de uma ansa, tendo o cuidado de verificar que todo o comprimento do cateter está em contacto com o meio.</p>
Sementeiras em meios sólidos em tubo	<u>Em superfície (B)</u>	<p>Este tipo de sementeira baseia-se em fazer estrias no selante do meio de cultura, utilizando uma ansa de 1µL, sem perfurar o meio.</p>
	<u>Em profundidade (A)</u> 	<p>Este tipo de sementeira consiste em perfurar o meio de cultura, com uma ansa de 1µL, retirando-a do mesmo modo.</p>

Sementes em meios líquidos em	<u>Inoculação com ansa</u>	A inoculação com ansa baseia-se em mergulhar uma ansa de 10µL, previamente inoculada, no tubo com o meio de cultura e proceder à sua homogeneização.
	<u>Inoculação com pipeta</u>	A inoculação com pipeta consiste em transferir uma toma da amostra, com uma pipeta de Pasteur, que é mergulhada no meio e cautelosamente é dispensado o seu conteúdo. Deve ser tomado em atenção a não formação de bolhas de ar.

Após a inoculação dos meios, segue-se a incubação em estufas próprias, respeitando as condições ótimas de crescimento dos microrganismos de interesse (Tabela VI).

Tabela VI - Condições ótimas de crescimento de microrganismos patogénicos.

Fator	Condições
Temperatura	35°C Estável
Humidade	>70% Meios de cultura hidratados
Atmosfera (consoante o microrganismo)	Aerofilia Capnofilia (5-10% CO ₂) Microaerofilia (<5% O ₂)
Tempo de incubação	18-24h Prolongado por mais 24h (ou mais) para alguns microrganismos fastidiosos

4.3.3 Testes orientativos / de identificação presuntiva

Após observação do crescimento nos meios de cultura selecionados, são executados alguns testes (Tabela VII) que orientam e/ou ajudam a fazer uma identificação presuntiva, que, muitas vezes, ajudam o clínico a escolher atempadamente uma terapêutica empírica mais adequada e permitem o profissional de laboratório a decidir qual o próximo passo da marcha neste processo de identificação de microrganismos patogénico. São exemplos de testes de identificação presuntiva:

- Teste da catalase
- Teste da coagulase
- Teste da oxidase
- Teste de sensibilidade à optoquina
- Teste da urease
- Testes de grupagem para identificação de *Streptococcus spp.*
- Testes serológicos para classificação em Grupos de *Salmonella spp.*

Tabela VII - Testes orientativos / de identificação presuntiva de microrganismos.

Teste	Objetivos	Comentários
Teste da Catalase	Distinguir estafilococos (catalase positivo) de estreptococos (catalase negativo). Também pode ser usado para a identificação presuntiva de bacilos de Gram positivo não formadores de esporos (listérias e corinebactérias – catalase positivo / lactobacilos e actinomices - catalase negativo).	O teste consiste em colocar em contacto, sobre uma lâmina, uma amostra da colónia do microrganismo que se pretende estudar com uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v). As catalases são enzimas que catabolizam o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, por isso, se se observar a formação de bolhas de oxigénio libertado na reação, o organismo é catalase-positivo (possui catalase, caso dos estafilococos), se não é catalase-negativo (estreptococos). As bolhas são formadas pelo oxigénio molecular libertado na reação da catalase. Deve ter-se especial cuidado quando se faz este teste a partir de colónias que cresceram em meios contendo sangue, porque o sangue contém catalase, e um arrastamento de meio agarrado à colónia pode originar um falso positivo.
Teste da Coagulase	Distinguir os <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase positiva) dos outros membros da família <i>Micrococcaceae</i> , genericamente designados <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa.	Quando uma colóni de <i>S. aureus</i> é suspensa num tubo contendo plasma, a coagulase liga-se ao fator (“clumping fator”) do soro, e este complexo converte o fibrinogénio em fibrina. Outra forma de testar a presença de <i>S. aureus</i> é através de kits comerciais que fazem a deteção simultânea do “clumping fator”, da proteína A e dos polissacarídeos capsulares do <i>S. aureus</i> A vantagem do teste comercial é a sua maior sensibilidade e rapidez.
Teste da oxidase	Distinguir colónias pertencentes família <i>Enterobacteriaceae</i> (oxidase negativa) de colónias de outras como <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Neisseria spp.</i> , <i>Campylobacter spp.</i> e <i>Pasteurella spp.</i> (oxidase positiva).	Este teste e realizado através de um kit comercial que usa um indicador de oxi-redução.
Teste de Sensibilidade à Optoquina	Identificação presuntiva de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	Permite distinguir <i>Streptococcus pneumoniae</i> de outros <i>Streptococcus</i> α -hemolíticos, como é o caso dos <i>Streptococcus</i> do grupo viridans. A presença de um halo de inibição superior a 14mm identifica presuntivamente <i>S. pneumoniae</i> , pois este ao contrário dos outros, é sensível a optoquina,
Teste da urease	Identificação presuntiva de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> (negativa).	A urease é uma enzima que hidrolisa a ureia com libertação de CO ₂ , H ₂ O e NH ₃ . A amónia em solução resulta numa alcalização do meio pois forma carbonato de amónio. Uma solução contendo fenolftaleína a pH <8,1 (incolor) com a adição de amónia fica rosa avermelhada devido a fenolftaleína mudar de cor a pH> 8,1. <i>Proteus spp.</i> (urease +) funciona como controlo positivo <i>Klebsiella spp.</i> (urease + fraco) <i>Escherichia coli</i> (urease -) funciona como controlo negativo.
Testes de grupagem para identificação de <i>Streptococcus spp.</i>	Agrupar segundo a classificação de Lancefield as diferentes classes de <i>Streptococcus spp.</i>	Classificação de Lancefield baseia-se nas características antigénicas de um polissacarídeo de composição variável, chamado carbohidrato C, localizado na parede da célula dos <i>Streptococcus spp.</i> . A composição variável do carbohidrato C permite agrupar os <i>Streptococcus spp.</i> em diferentes grupos designados por letras do alfabeto (A, B, C, F, G). 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 antigénios.
Testes serológicos para classificação em Grupos de Salmonellas	Serotipar <i>Salmonella spp.</i>	De acordo com a espécie de <i>Salmonella spp.</i> em causa, podem ser identificados diferentes tipos de antigénios, o que permite a sua classificação em grupos: - Antigénios somáticos (O) - são compostos por polissacarídeos, designados por números e classificados como antigénios Major ou Minor; - Antigénios flagelares (H) - são de natureza proteica, sendo que

	<p>a cadeia de aminoácidos é determinada pelos genes H1 e H2 e conferem a presença e mobilidade dos flagelos;</p> <p>- Antígeno de superfície (Vi) - só está presente em três serótipos: <i>S. typhi</i>, <i>S. paratyphi C</i> e <i>S. dublin</i>. Este antígeno permite mascarar a presença do antígeno O, tornando-o inaglutinável.</p> <p>Esta prova baseia-se numa reação de aglutinação pelo que são utilizados reagentes compostos por anticorpos específicos para cada um dos antígenos.</p> <p>A reação de aglutinação remete para a presença do antígeno em questão em detrimento dos outros antígenos do mesmo tipo. A ausência de aglutinação permite inferir a inexistência do antígeno testado.</p>
--	---

4.3.4 Identificação bacteriana

Sistemas de identificação automatizados

No SPC do Hospital Sousa Martins, a maioria dos microrganismos é identificada através do sistema automatizado de identificação bacteriana VITEK[®] 2 Compact da Biomerieux[®] (Fig.7). Este sistema usa cartas de identificação (Fig.8) que contêm diferentes substratos bioquímicos que permitem identificar fenotipicamente os diferentes microrganismos, das quais destacamos:

- GN Card – Identificação de Gram negativos
- GP Card – Identificação de Gram positivos
- ANC Card – Identificação de Bacilos Gram positivos
- NH Card – Identificação de *Campylobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*.
- YST Card – Identificação de leveduras



Figura 4 - Sistema automático de identificação bacteriana - Vitek[®] 2 Compact.



Figura 5 - Cartas de identificação de microrganismos utilizadas pelo Vitek® 2 Compact.

Para isso, é preparada uma suspensão de acordo com a escala de MacFarland dependendo das especificidades do microrganismo a identificar. As cartas são colocadas na suspensão e inseridas no equipamento que vai aspirar a suspensão para o interior dos poços, selar as cartas e proceder à sua incubação. De 15 em 15 minutos é feita a monitorização automática da alteração da cor / turvação em cada um dos poços. Os resultados são depois integrados informaticamente, obtendo-se a identificação do microrganismo.

4.3.5 Testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

O conhecimento da resposta de um microrganismo a um determinado antibiótico é de extrema importância para que possa ser implementada uma terapêutica eficaz.

Com o objetivo de poder dar ao médico a melhor opção terapêutica para o microrganismo identificado, são efetuados testes de sensibilidade aos antibióticos, recorrendo a diferentes métodos:

Sistema automatizado

O sistema utilizado neste serviço é o 'Sistema VITEK® 2 'Compact da Biomerieux® que usa cartas de antibiograma específicas para o organismo identificado. A determinação da sensibilidade aos antibióticos neste sistema baseia-se no cálculo da concentração inibitória mínima (MIC) de diferentes antibióticos presentes nas cartas. Assim, a partir da suspensão preparada para a identificação, é preparada uma nova suspensão, de concentração variável dependendo do microrganismo em estudo, que é processada de forma semelhante à da identificação. Neste caso, nos poços não existem substratos bioquímicos, mas sim diferentes concentrações de antibióticos liofilizados. A leitura realizada pelo equipamento (também em

intervalos de 15 minutos) vai medir a alteração da turvação, proporcional ao crescimento bacteriano, nos diferentes poços. Com base nessa informação são construídas curvas que nos permitem determinar as MIC para os diferentes antibióticos. Os resultados são depois analisados pelo equipamento, que vai reportar o padrão de sensibilidade / resistência da bactéria em estudo aos diferentes antibióticos testados.

Posto isto, os resultados do equipamento são analisados e os antibióticos são comunicados ao clínico, tendo em conta o produto/tipo de infeção e de acordo com as normas da EUCAST.

Discos impregnados de antibiótico / E-tests

Quando a sensibilidade aos agentes antimicrobianos não pode ser detetada no sistema automático, quer porque o antibiótico que se pretende estudar não se encontra nas cartas disponíveis no laboratório, quer porque o microrganismo que se pretende estudar não tem ainda carta de antibiograma comercializada, podem ser realizados testes de suscetibilidade recorrendo a discos impregnados de antibióticos ou a tiras com gradiente de concentração de antibiótico que permitem determinar a MIC em placa, conhecidos como E-tests. Estes testes são efetuados de acordo com as normas padronizadas para a realização de antibiogramas pelo método de difusão em agar (EUCAST), de acordo com o microrganismo a testar dependendo das suas características de crescimento, podendo utilizar-se assim o meio de Muller-Hinton para a maioria dos microrganismos, a GS para as estirpes de *Streptococcus spp.* e a GC para estirpes de crescimento fastidioso, como é o caso dos *Haemophilus spp.*

Esses métodos foram também utilizados para confirmar alguns mecanismos de resistência, nomeadamente, produção de beta-lactamases de espectro alargado, beta-lactamases Ampc, metalobeta-lactamases e carbapenemases.

4.3.6 Produtos processados para exame cultural

As diferentes amostras biológicas que chegam ao laboratório são processadas de acordo com as etapas do diagnóstico microbiológico referidas anteriormente e atendendo à especificidade de cada uma e aos microrganismos mais provavelmente responsáveis pela infeção.

I. Sangue

A hemocultura é um dos procedimentos mais importantes realizados no laboratório de microbiologia clínica. Os fatores que mais determinam o sucesso da hemocultura são o volume de sangue processado, pois deve ser colhido sempre o volume requerido para o tipo de meio de hemocultura em causa e a hora da colheita, uma vez que o sangue deve ser colhido antes do pico febril, isto é, durante a ascensão da febre, quando o número de bactérias viáveis no sangue é maior. Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infeção.[23]

Meios para exame cultural

As garrafas são colocadas num aparelho para incubação de hemoculturas, o BacT/ALERT® 3D, durante pelo menos 5 dias ou até deteção de uma amostra positiva. O aparelho deteta o crescimento bacteriano através da produção de CO₂. Quando o equipamento dá indicação de uma garrafa de hemocultura positiva esta é retirada do equipamento e após a preparação de uma lâmina para coloração pelo método de Gram são inoculados os seguintes meios:

- GS - incuba em aerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1



Figura 6 - Sistema de incubação de hemoculturas - Bactalert 3D.

Cultura de catéter

Um cateter deve chegar ao laboratório, sempre acompanhado de uma hemocultura, e deve ser semeado por dois métodos, pela técnica de Maki que consiste no rolamento do cateter em placa e semeado quantitativamente após sonicação para libertação das bactérias do biofilme que se forma no lúmen do catéter. Os meios para cultura são:

- GS - incuba em aerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1

Só deve ser valorizado o crescimento de microrganismos se o mesmo microrganismo for isolado na hemocultura, caso contrário considera-se que o cateter está colonizado.

2. Líquido cefalorraquidiano

A meningite bacteriana é uma doença grave que esta associada a alta morbidade e mortalidade se o agente etiológico não for diagnosticado prontamente. Por isso, o estudo de um líquido cefalorraquidiano de um doente com suspeita de meningite é sempre urgente, devendo ser processado tão rapidamente quanto possível. Pelo facto de alguns agentes patogénicos mais comuns e normalmente responsáveis por doença serem pouco resistentes a condições ambientais (p. ex., *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*), as amostras de LCR devem ser processadas imediatamente após a colheita. Ao ser recebido no laboratório, a amostra deve ser centrifugada para concentração e o sedimento é usado para semear os meios de cultura e para preparar o esfregaço para ser corado pelo método de Gram. O laboratório deve comunicar imediatamente ao médico se microrganismos foram observados microscopicamente na coloração de Gram ou após crescimento de colónias em cultura até às 24/48h.

Meios para exame cultural

- GS - incuba em aerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1

Outros exames são realizados em simultâneo para que o diagnóstico seja feito com a maior celeridade:

- Observação macroscópica do líquido para verificação da cor e turvação
- Contagem de células

- Exame bioquímico do líquido com pesquisa de proteínas e glicose
- Pesquisa de antígenos capsulares (teste rápido de aglutinação que pesquisa a presença dos antígenos da cápsula das principais bactérias responsáveis por meningite: *E. coli*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*)
- Pesquisa por biologia molecular de um painel de bactérias que podem estar associadas a meningite, nomeadamente *H. influenza*, *L. monocytogenes*, *M. meningitidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, de vírus como *Citomegalovírus*, *Herpes simplex vírus*, *Herpes vírus 2*, *Human herpes vírus*, *Vírus varicela-zoster* e de leveduras como é o caso do *Cryptococcus neoformans*.

3. Outros líquidos normalmente estéreis

Uma variedade de outros líquidos orgânicos (líquido pleural, peritoneal, sinovial e pericardial) pode ser colhida para cultura bacteriológica. Estes líquidos são normalmente estéreis e qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado.

Pelo facto de poucos microrganismos poderem estar presentes na amostra, é importante cultivar o maior volume de líquido possível. No entanto, se somente pequenas quantidades de líquidos forem colhidas a amostra deve ser semeada diretamente nos meios sólidos e em simultâneo num tubo com meio líquido de enriquecimento.

Meios para exame cultural

- GS - incuba em aerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1

Além disso, estes líquidos são sujeitos a contagem celular por citometria de fluxo e a exame bioquímico para determinação de parâmetros como proteínas, glucose, ADA, etc.

4. Amostras do trato respiratório superior

As infeções das vias respiratórias superiores são muito frequentes, sendo a maior parte de etiologia viral. O diagnóstico bacteriológico dessas situações representa uma tentativa de identificar, entre uma flora indígena abundante, o(s) agente(s) implicado(s) na infeção.

Existe uma flora mista abundante, constituída por aeróbios e anaeróbios. Vários agentes patogénicos tais como o *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, leveduras e

membros das *Enterobacteriaceae*, podem constituir uma flora transitória ou estar presente em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis.

Na faringite bacteriana a principal causa é o *Streptococcus* α -hemolítico do grupo A. Outras causas de faringite são a *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*, devendo a pesquisa destes agentes ser feita exclusivamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do médico.

Outras infecções do trato respiratório superior podem envolver a epiglote e os seios nasais.

A epiglote é, geralmente, de etiologia bacteriana, sendo na sua maioria provocada pelo *Haemophilus influenzae* tipo B. A colheita de amostras da epiglote está contra indicada pois pode originar uma completa obstrução das vias aéreas. Sendo assim, o diagnóstico é essencialmente clínico e através de hemoculturas (positivas em cerca de 50% dos casos).[23]

A sinusite é frequentemente de origem endógena, a partir de microrganismos presentes nas vias aéreas superiores, como é o caso do *Streptococcus pneumoniae* e do *Haemophilus influenzae*.

A cultura dos microrganismos do trato respiratório superior faz-se após colheita de amostra da orofaringe por zaragatoa e posterior sementeira em meio GS e meio GC.

Meios para exame cultural

- GS - incuba em aerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1

5. Amostras do trato respiratório inferior

As amostras do trato respiratório inferior incluem as expetorações, as secreções brônquicas, os aspirados traqueais, os aspirados traqueo-brônquicos, os aspirados brônquicos e os lavados bronco-alveolares. Pela facilidade de obtenção, as amostras de expetoração, secreções brônquicas e aspirados traqueais são as mais recebidas no laboratório. O diagnóstico de infecção respiratória inferior nestas amostras é, frequentemente, dificultado pela contaminação das mesmas por flora comensal da orofaringe durante a colheita.

O laboratório deve processar apenas amostras de boa qualidade e que representem o estado clínico do doente, para que a contaminação da amostra por microrganismos das vias aéreas superiores não a inutilize.

De acordo com as recomendações do Cumulative Techniques and Procedures Clinical Microbiology (CUMITECH) e a Tabela de Murray e Washington, as amostras biológicas com Células Epiteliais ≥ 25 por campo, são geralmente inaceitáveis para exame bacteriológico por excessiva contaminação orofaríngea. Por isso, para as amostras suscetíveis de contaminação (expetorações, secreções brônquicas e aspirados traqueais) deve ser feito, primeiramente, um exame citológico, pela observação microscópica da amostra pela coloração de Leishman, para que possa ser verificada a sua qualidade pela contagem de células epiteliais e de leucócitos polimorfonucleares, de acordo com a tabela de Murray e Washington (Tabela VIII).

Tabela VIII - Tabela de Murray e Washington.

	Células epiteliais / pequena ampliação (10x)	Leucócitos / pequena ampliação (10x)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

Meios para exame cultural

Após a observação da lâmina, as amostras dos grupos 4 e 5 da tabela anterior são semeadas em:

- GS - incuba em aerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 48 horas a 35°C +/-1
- Gelose SGC - incuba em aerofilia à temperatura ambiente até às 72 horas (apenas se semeia este meio para os Aspirados Traqueo-Brônquicos, os Aspirados Brônquicos e os Lavados Bronco-Alveolares).

Após incubação, segue-se observação dos meios, para a identificação das colónias suspeitas. Devido à possibilidade de presença de flora contaminante, devemos valorizar as colónias presentes em função das bactérias predominantes e das bactérias visualizadas no Gram.

Os principais microrganismos patogénicos isolados na expetoração são os seguintes:

- *Streptococcus pneumoniae* – Colónias alfa-hemolíticas no meio GS acompanhadas de diplococos gram-positivo na coloração de Gram. No caso de suspeita da presença de *S. pneumoniae* procedemos ao isolamento das colónias suspeitas e à identificação em

sistema automatizado e presuntiva com base na sensibilidade dos pneumococos à optoquina.

- *Staphylococcus aureus* – Origina, geralmente, colónias beta-hemolíticas no meio gelose de sangue e cocos gram-positivo positivo em cacho ou em tetradas na coloração de Gram. Na presença de colónias suspeitas, após o isolamento das mesmas, faz-se o teste da catalase e da coagulase e se forem os dois positivos faz-se a identificação e o antibiograma em sistema automatizado.
- *Moraxella catarrhalis* - é um diplococo gram-negativo que origina colónias que são facilmente arrastadas no meio com a ajuda de uma ansa, mantendo-se intactas. São oxidase e catalase positivas, confirmando-se a identificação em sistema automático.
- *Enterobacteriaceae spp.* e *Pseudomonas spp.* – Além de crescerem no meio de GS crescem também no meio de MCK. No Gram observamos bacilos gram-negativo. Na presença de colónias suspeitas faz-se o teste da oxidase (no caso de colónias não fermentadoras da lactose) para ajudar na seleção da carta a utilizar no antibiograma automatizado.
- *Haemophilus influenzae* – cresce apenas em GC. Na presença de colónias suspeitas, acompanhadas da observação de cocobacilos pleomórficos gram-negativo na coloração de Gram, faz-se identificação automática e antibiograma manual por E-testes ou galeria ATB por microdiluição.

6. Amostras do aparelho auditivo e ocular

A timpanocentese (i.e., a aspiração de líquidos do ouvido médio) é feita quando se pretende fazer um diagnóstico específico de uma infeção do ouvido médio. Isto é desnecessário na maioria dos doentes, no entanto, porque os patógenos mais comuns que causam estas infeções (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*) podem ser tratados sintomaticamente. Por outro lado, as infeções do ouvido externo são tipicamente causadas por *P. aeruginosa* (“ouvido de nadador”) ou *S. aureus*. [24] A amostra apropriada para cultura é um raspado da área do ouvido envolvida, mas a mais recebida no laboratório é a zaragatoa de contato da área infetada cuja colheita é efetuada pelo médico otorrinolaringologista.

Nas infeções oculares, as indicações e técnicas para investigação bacteriológica são determinadas pela localização da infeção (ocular ou peri-ocular), sua gravidade e rapidez de instalação e pelo conhecimento dos principais agentes implicados. As infeções oculares podem ser divididas em:

- Infecções das estruturas externas do olho (blefarites - *S. aureus*, *S. epidermidis*; conjuntivites - *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*; e queratites - *P. aeruginosa*, *S. aureus*);
- Infecções das estruturas internas do olho (endoftalmites - *S. aureus*, *P. aeruginosa*);
- Infecções do sistema lacrimal (canaliculites- *A. israelii*, *P. propionicus*, *M. catarrhalis*; dacriocistites e dacrioadenites - *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*).

Devido à constante ação de lavagem das lágrimas, o número de bactérias isoladas de algumas infecções oculares é geralmente baixo, pelo que se recomenda a utilização de um grande inóculo e a sementeira em vários meios de cultura.

Meios para exame cultural

Habitualmente, semeia-se um meio líquido (Trypticase soja ou BHI) para enriquecimento do inóculo e depois:

- GS - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1

7. Amostras de feridas, pés e tecidos

Feridas abertas fistuladas podem ser frequentemente colonizadas por microrganismos potencialmente patogénicos não relacionados ao processo infeccioso específico. Portanto, é importante colher amostras da profundidade da ferida após a superfície ter sido bem limpa.[24] Sempre que possível deve-se evitar a colheita de amostra com zaragatoa, porque é difícil obter uma amostra representativa sem contaminação com microrganismos que colonizam a superfície. Da mesma forma, o aspirado de um abscesso fechado deve ser colhido tanto do centro como das paredes do abscesso, uma vez que a maioria dos microrganismos se multiplica ativamente na base do abscesso e não no centro.

Os tecidos devem ser obtidos de uma porção representativa do processo infeccioso, com múltiplas amostras colhidas preferencialmente.

Meios para exame cultural

- GS - incuba em aerofilia até às 24-48 horas a 35°C +/-1
- GC - incuba em microaerofilia até às 24-48 horas a 35°C +/-1
- Gelose SGC - incuba em aerofilia à temperatura ambiente até às 72 horas
- Gelose DCO - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1
- Gelose MSA - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1

- Gelose MRSA - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1
- Gelose MCK - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1

8. Urina

O aparelho urinário é formado pelos rins, ureteres, bexiga e uretra, sendo que esta última estrutura possui uma microflora residente.

Pelo facto de bactérias potencialmente patogénicas colonizarem a uretra, a primeira porção da urina coletada por micção espontânea ou cateterização deve ser descartada. Desta forma, as bactérias podem invadir a bexiga e causar infeção por duas vias principais: ascendente e descendente. Embora a via ascendente seja mais frequente, ela é favorecida por introdução de corpos estranhos ao organismo (ex. cateter urinário). Ao introduzir um cateter urinário, as bactérias podem ser introduzidas diretamente na bexiga ou, mover-se através deste instrumento da uretra até à bexiga, aumentando desta forma o risco de infeção. A disseminação por via descendente pode ser resultado de uma bacteriemia. Qualquer infeção sistémica pode provocar infeção urinária, mas certos microrganismos, como *S. aureus* ou espécies de *Salmonella*, são particularmente invasivos. A via descendente é causadora de menos de 5% das infeções do trato urinário.

Meios para exame cultural

- Meio CLED - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1

Quando chega ao laboratório, a urina é semeada em meio de CLED sendo a inoculação feita com uma ansa calibrada de 10 µL para permitir a análise quantitativa das colónias. O meio é incubado a 36±1°C durante aproximadamente 24 horas.

Uma amostra é considerada positiva sempre que apresentar no máximo duas colónias diferentes e com uma contagem por tipo de colónias entre 10⁴ e 10⁵ UFC/mL ou superior. Contagens inferiores podem ser valorizadas em caso de amostra obtida por punção supra-púbica, em que qualquer crescimento deve ser valorizado.

No caso de serem três ou mais tipos de microrganismos, existe uma indicação forte de contaminação da amostra por colheita inadequada, sendo essa indicação enviada ao médico.

Testes rápidos na urina para diagnóstico de infeções respiratórias

São realizados testes rápidos e quantitativos para a pesquisa de antígenos de *Legionella* e *Streptococcus pneumoniae*, a partir de amostras de urina, que se baseiam em ensaios

imunocromatográficos e que visam a detecção rápida e qualitativa de antígenos solúveis específicos na urina.

9. Exsudados vaginais e uretrais

As infecções genito-urinárias podem ser causadas por transmissão sexual de parasitas (*Trichomonas vaginalis*), de bactérias (*Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*) ou de vírus (Herpes simplex virus, HPV, HIV). Outra causa importante de infecção são os desequilíbrios da flora genito-urinária, tendo em conta que do trato genital feminino fazem parte Lactobacilos, Difteroides, *Gardnerella vaginalis*, estafilococos coagulase-negativos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus spp.*, estreptococos alfa e beta-hemolíticos, *Escherichia coli* e leveduras como a *Candida albicans* e que o trato genital masculino tem uma flora pobre em microrganismos, estando estas infecções associadas aos estafilococos, micrococos, corynebacterias e estreptococos alfa hemolíticos.

Meios para exame cultural

- GS - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1;
- GC - incuba em microaerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1;
- Gelose VCA - para pesquisa de *N. gonorrhoeae* - incuba em microaerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1;
- Gelose GAR - para isolamento seletivo de *Gardnerella vaginalis* - incuba em microaerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1;
- Gelose CAN - para pesquisa e isolamento de diferentes espécies de *Candida spp.*;
- Meio Todd Hewitt e posterior passagem para meio Granada - para pesquisa de *Streptococcus* do grupo B - o meio Todd Hewitt incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1 e depois é semeado meio de Granada e incubado em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1; apenas em mulheres em idade fértil.

Pesquisa de *S. agalactiae* em grávidas

A pesquisa de *Streptococcus* do grupo B (*S. agalactiae*) é realizada a todas as grávidas entre a 35-37ª semana de gravidez.

A cada grávida é colhida uma zaragatoa vaginal e uma zaragatoa retal que quando chegam ao laboratório são inseridas num tubo contendo meio de Todd-Hewitt (meio líquido destinado

ao enriquecimento das diferentes espécies de *Streptococcus spp.*). Após 24 horas é feita uma passagem para meio de Granada (meio cromogénico para isolamento de *S. agalactiae*) que é incubado em atmosfera de anaerobiose a 35°C.

Após 24 horas as placas são observadas para pesquisa de colónias alaranjadas que identificam presuntivamente o *S. agalactiae*. A identificação é confirmada pelo teste de Lancefield e pela identificação e antibiograma automatizados.

Pesquisa de *Trichomonas vaginalis* em exsudados vaginais

A tricomoníase é uma doença sexualmente transmissível causada pelo parasita *Trichomonas vaginalis*. Afeta homens e mulheres, mas apenas as mulheres são sintomáticas.

A pesquisa de *Trichomonas vaginalis* em exsudados vaginais é feita através de um teste rápido imunocromatográfico que deteta a presença de antígenos trichomonas.

10. Fezes

Uma grande variedade de bactérias pode causar infeções gastrointestinais. Para que estas bactérias sejam isoladas a partir de uma cultura, deve ser recolhida uma amostra adequada de fezes diarreicas ou fezes moldadas e semeada em meios de cultura seletivos apropriados, descritos a seguir.

Meios para exame cultural

- Caldo GN - incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1;
- Meio XLD - para *Salmonella* e *Shigella* - incuba em aerofilia até 24 horas a 35°C +/-1;
- Meio YER - para *Yersinia spp.* - incuba em aerofilia até 24 horas a 32°C +/-1;
- Meio CAM - para *Campylobacter spp.* - incuba em capnofilia até 48 horas a 35°C +/-1;
- Meio MSA - para *Staphylococcus aureus* - incuba em aerofilia até 24 horas a 35°C +/-1;
- Meio MRSA - para *Staphylococcus aureus* metilina resistente- incuba em aerofilia até às 24 horas a 35°C +/-1;

Para além destes meios, as fezes são ainda semeadas num caldo de enriquecimento para microrganismos gram-negativos (caldo GN). Este meio incuba durante 6-8 horas a 37°C e ao fim deste período faz-se uma passagem para o meio XLD para isolamento de *Salmonella* e *Shigella*.

Ao fim do período de incubação, observam-se as placas para pesquisa de colónias características. As colónias suspeitas devem ser identificadas:

- Colônias suspeitas no meio de *Yersinia spp.* (YER) - As colônias de cor rosa escura ou vermelho são consideradas suspeitas;
- Colônias suspeitas nos meios para pesquisa de *Salmonella* e *Shigella* (XLD) - As colônias não fermentadoras da lactose e/ou de centro negro (resultante da produção de H₂S) são consideradas colônias suspeitas, uma vez que os principais agentes de gastroenterite não têm a capacidade de fermentar a lactose presente no meio e que estas bactérias são produtores de H₂S. Há, no entanto, outras bactérias que fazem parte da flora saprófita habitual do intestino, como o *Proteus spp.*, que também originam colônias não fermentadoras no meio de XLD. Para que estas bactérias se possam distinguir é feito o teste da urease, sendo que o *Proteus spp.* é urease positivo e a *Salmonella spp.* e a *Shigella spp.* são urease negativo.
- Colônias suspeitas no meio para *Campylobacter spp.* (CAM) - a morfologia das colônias é confirmada através de exame microscópico após coloração de Gram.
- Colônias suspeitas no meio para *Staphylococcus aureus* (MSA) - Colônias fermentadoras do manitol são suspeitas de ser colônias de *Staphylococcus aureus*;
- Colônias suspeitas de *Staphylococcus aureus* metilina resistente - Colônias suspeitas de ser *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina aparecem de cor purpura neste meio.

Sempre que apareçam colônias suspeitas em cada um dos meios é feita identificação e antibiograma no sistema automatizado.

Testes rápidos nas fezes

São ainda realizados, nas fezes, testes de quimioluminescência para detecção de antígenos do rotavírus, do adenovírus e do *Clostridium difficile*. Além disso, a presença da estirpe toxigénica do *Clostridium difficile* é confirmada por biologia molecular.

Pesquisa de parasitas

Nas fezes, a pesquisa de parasitas é outro estudo frequente em laboratório e é feita após um método de concentração por sedimentação, sendo o sedimento observado a fresco entre lâmina e lamela para observação dos diferentes elementos parasitários. Para cada utente, são processadas três amostras de fezes colhidas em dias diferentes para aumentar a sensibilidade da técnica. Adicionalmente é realizada a pesquisa de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium spp.* por um método imunocromatográfico.

4.3.7 Microbiologia serológica e antigénica

O diagnóstico serológico das doenças infecciosas é realizado através da pesquisa e dosagem dos anticorpos das classes IgM, IgG e IgA, produzidos pelo organismo em resposta a um agente infeccioso, sendo que anticorpos do tipo IgA estão mais associados a infeções virais ou bacterianas das mucosas. Estes testes serológicos são feitos, maioritariamente, por imunoensaios de micropartículas por quimioluminescência, por ensaios imunoenzimáticos ou por imunoensaios antigénio-anticorpo rápidos.

Classicamente, o primeiro anticorpo a ser produzido na infeção primária é da classe IgM, sendo, então, acompanhado pela produção de anticorpos da classe IgG. Os anticorpos IgM ficam presentes por um curto período de tempo, normalmente desaparecendo de três a seis meses após a infeção, enquanto os anticorpos IgG permanecem presentes por longo período, por vezes o resto da vida. Portanto, a presença de anticorpos IgM é indicativa de infeção aguda ou recente, e a presença somente de IgG, de infeção passada.

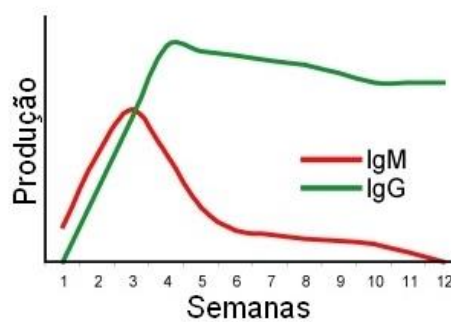


Figura 7 - Produção de anticorpos em relação ao tempo.

Entretanto, com o desenvolvimento, nos últimos anos, de novas metodologias que apresentam maior sensibilidade para o diagnóstico dos processos infecciosos, esse conceito tem-se alterado devido à possibilidade da deteção de IgM por um período prolongado.

Esses anticorpos IgM, denominados residuais, podem ser detetados, geralmente, em valores baixos, até 18 a 24 meses após a infeção. A sua presença, juntamente com anticorpos IgG, por vezes, dificulta a interpretação do tempo de infeção. Além disso, os anticorpos IgM podem ser detetados na reinfeção ou reativação de processos infecciosos bem como em reações cruzadas.

Recentemente, foi desenvolvido um método de ensaio imunoenzimático capaz de diferenciar infeção recente de infeção passada, com a presença de IgM residual, através da avaliação da capacidade de ligação dos anticorpos IgG. Tal capacidade de ligação, denominada avidéz, é diretamente proporcional ao tempo de infeção.

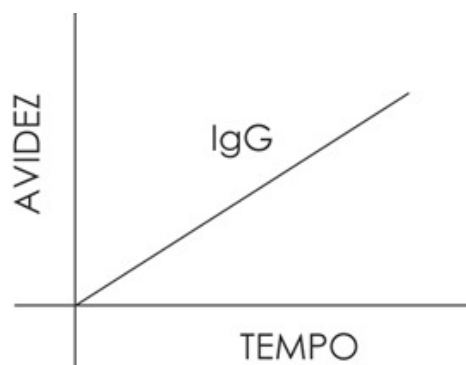


Figura 8 - Capacidade de ligação dos anticorpos IgG.

Em quadros infecciosos com até três a quatro meses de evolução, a IgG apresenta uma baixa avididade, enquanto que, em infecções com mais de quatro meses de evolução, os anticorpos IgG apresentam alta avididade. Em algumas situações, estes anticorpos podem apresentar uma avididade intermediária, o que impossibilita a definição segura do tempo de infecção.

O teste de avididade para anticorpos IgG tem grande importância, principalmente em pacientes grávidas que apresentam simultaneamente anticorpos das classes IgM e IgG no exame pré-natal para as doenças infecciosas que podem acometer o feto. Nessa situação, a determinação do tempo de infecção é de extrema importância, pois pode definir a necessidade de tratamento caso a infecção tenha ocorrido durante a gravidez, como no caso da toxoplasmose, ou tranquilizar a gestante e o médico, caso a infecção tenha ocorrido antes da gravidez.

Embora o teste de avididade já tenha sido utilizado no diagnóstico de numerosas doenças infecciosas, hoje a sua maior aplicação é no diagnóstico da toxoplasmose, rubéola e citomegalovírus e, principalmente em pacientes gestantes.

Diagnóstico da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infecção provocada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, transmitida pelo solo, alimentos, água e fezes de animais contaminados, que pode causar graves alterações neurológicas no feto, ou até mesmo aborto, quando a mulher grávida é contaminada durante a gestação, uma vez que o parasita tem a capacidade de atravessar a placenta. É, por isso, de extrema importância que se faça o rastreio de toxoplasmose em todas as mulheres grávidas. A IgM indica uma infecção em fase aguda (recente), enquanto que a IgG em fase crônica. Estas determinações são feitas por imunoenaios de micropartículas por quimioluminescência, e os resultados positivos confirmados por tecnologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Diagnóstico da febre tifoide e paratifoide

Reação de Widal - teste rápido de aglutinação antigénio-anticorpo, tendo como objetivo a deteção de anti-Salmonella nas amostras em estudo. Na realização deste teste são utilizados antigénios H (do flagelo) de *Salmonella typhi* e de *Salmonella paratyphi* A e B e o antigénio O somático da *Salmonella typhi*.

Em casos de resultados positivos, ou seja, na presença de aglutinação, é necessário proceder às sucessivas diluições da amostra (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320), sendo depois o resultado dado pelo inverso da diluição, para o qual ainda se verifica aglutinação, para assim se determinar o título de anticorpo presente na mesma. Este é determinado na última diluição positiva, podendo este ser um positivo fraco ou não. Quando não existe aglutinação estamos perante um resultado negativo.

Diagnóstico da febre da carraça

Reação de Weil-Felix- teste rápido de aglutinação antigénio-anticorpo, isto é, um imunoensaio de aglutinação realizado em placas tendo como objetivo a deteção de anti-Rickettsia em soro. Em casos de resultado positivo, ou seja, na presença de aglutinação, devem realizar-se diluições sucessivas da amostra (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320), sendo depois o resultado dado pelo inverso da diluição, para assim se determinar o título de anticorpo presente na mesma. Este é determinado na última diluição positiva, podendo este ser um positivo fraco ou não. Quando não existe aglutinação estamos perante um resultado negativo.

Diagnóstico da Brucelose

O diagnóstico da Brucelose é feito através de dois testes de imunoensaio de aglutinação antigénio-anticorpo, o teste de Rosa de Bengala e a reação de Wright, tendo como objetivo a deteção de anticorpos dirigidos para *Brucella spp.*. O teste de Rosa de Bengala consiste em colocar o soro do paciente em contato com o antígeno Rosa de Bengala, se a amostra possuir anticorpos específicos da brucelose, desenvolve-se uma reação de aglutinação visível a olho nu em intensidade variável. A Reação de Wright é um imunoensaio de pesquisa de anticorpos anti-brucella para confirmação de positivos no teste de Rosa de Bengala.

O resultado é dado como negativo (ausência de aglutinação) ou positivo (presença de aglutinação).

Diagnóstico de infeção por *Streptococcus* do grupo A

Os *Streptococcus* do grupo A (SGA) constituem um foco de interesse não apenas devido ao seu papel casual na faringite estreptocócica aguda e em outras infeções piogénicas, mas também devido à sua associação com sequelas pós-estreptocócicas, mais especificamente com a febre reumática aguda e a glomerulonefrite aguda.

A pesquisa é feita por imunocromatografia que apesar de ser um ensaio qualitativo, é rápido para a deteção de antígenos de *Streptococcus* grupo A em amostras de esfregaços de garganta colhidos com zaragatoa. Este teste baseia-se num método que usa uma combinação única de corante conjugado monoclonal com anticorpos policlonais em fase sólida. À medida que a amostra flui através do dispositivo absorvente, o corante marcado liga-se ao antígeno SGA, formando um complexo antígeno-anticorpo. Este complexo liga-se ao anticorpo anti-SGA presente a nível da zona de teste, levando ao aparecimento de uma banda colorida.

Diagnóstico da sífilis

A sífilis é causada por infeção com a bactéria *Treponema pallidum* (TP) que pode ser transmitida congenitamente ou por contacto sexual e o seu diagnóstico é feito com recurso a testes treponémicos e não treponémicos. Os testes treponémicos baseiam-se na deteção de antígenos específicos do *Treponema pallidum* e os testes não treponémicos, nomeadamente, o RPR (rapid plasma reagin) e o VDRL (venereal disease research laboratory) utilizam antígenos contendo cardiolipinas que aglutinam na presença de anticorpos antitreponémicos. O resultado destes testes é expresso de forma qualitativa (positivo/negativo) ou é quantificado num título que representa a maior diluição na qual se obtém um resultado positivo. Estes testes são positivos a partir da 4ª ou 5ª semana após a infeção e ficam negativos em cerca de 25% a 30% dos doentes na fase tardia, sem tratamento.

As normas europeias recomendam o teste treponémico como teste de rastreio inicial que, em caso de positividade, deverá ser sempre confirmado com outro teste treponémico. Nestas normas os testes não-treponémicos VDRL e RPR encontram-se destinados apenas à monitorização da atividade serológica da doença e a resposta ao tratamento, sendo realizados apenas se o teste confirmatório for positivo.[25]

Diagnóstico de mononucleose infecciosa

A mononucleose infecciosa é uma doença provocada pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV), que se caracteriza por fadiga, febre, faringite e linfadenopatia. O diagnóstico é clínico ou feito por testes de anticorpos heterófilos. O EBV também se encontra associado ao linfoma de Burkitt e ao carcinoma nasofaríngeo. É principalmente transmitido pela saliva, mas tem sido observada transmissão por via sexual.

Os testes específicos estão relacionados com a resposta de anticorpos dependente do tempo a vários antígenos produzidos durante o ciclo de vida do vírus EBV (VCA- viral capsid antigen, EBNA - Epstein-Barr nuclear antigen).[26]

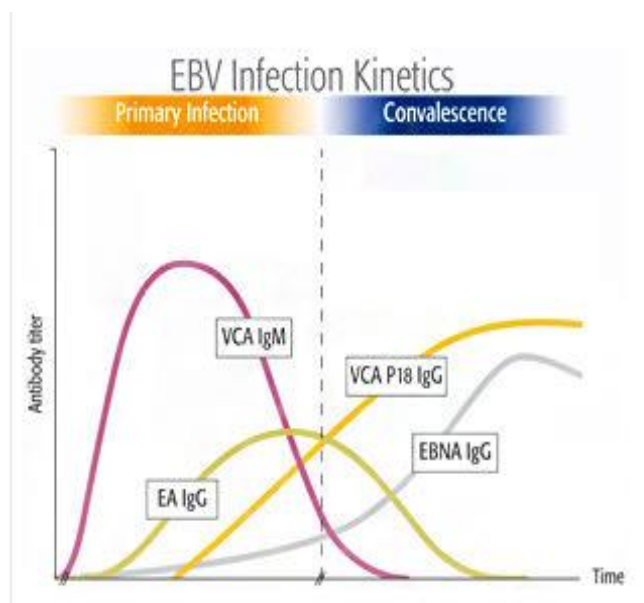


Figura 9 - Resposta de anticorpos dependente do tempo a vários antígenos produzidos durante o ciclo de vida do vírus de *Epstein-Barr*.

Diagnóstico da rubéola

A rubéola é uma doença viral causada pelo togavírus e transmitida por via respiratória, cujos sintomas são muito parecidos com outras doenças virais comuns na infância, como sarampo e papeira. Por norma, é uma doença auto-limita que não necessita tratamento, mas na mulher grávida o vírus atravessa a placenta e pode causar morte fetal ou malformações graves no feto. A determinação dos anticorpos anti-rubéola IgG e IgM é feita por imunoenaios de micropartículas por quimioluminescência, e os resultados positivos confirmados por tecnologia ELFA.

Diagnóstico de infecção por citomegalovírus

O citomegalovírus, da família do vírus herpes, provoca infecções que ficam latentes durante toda a vida, com reativações ocasionais e com infecções recorrentes. Em resposta ao vírus, o organismo produz anticorpos IgG e IgM que podem ser detetados no sangue por imunoenaios de micropartículas por quimioluminescência, e os resultados positivos confirmados por tecnologia ELFA.

Diagnóstico de hepatite viral

Uma hepatite é uma inflamação do fígado que pode ter diversas causas, sendo as mais comuns as hepatites virais. Quando ocorre uma hepatite, o fígado não consegue desempenhar as suas funções e as lesões nele causadas podem evoluir para cirrose grave ou cancro.

Os principais tipos de hepatite viral são a hepatite A, a hepatite B e a hepatite C.

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. A presença de anticorpos IgG anti-HAV, associada a um resultado de anticorpos IgM anti-HAV não reativo, indica infecção passada pelo vírus da hepatite A (HAV) ou vacinação contra o HAV.

A hepatite B é a mais perigosa das hepatites virais, pois o risco de morte por cirrose ou/ou cancro do fígado é muito elevado. Os marcadores que permitem diagnosticar a hepatite B (AgHBs anti-HBs anti-HBc total e IgM antiHBe agHBe) surgem no sangue em tempos diferentes (Figura 6). Normalmente, o primeiro a detetar-se é o antígeno HBs (antígeno de superfície), que persiste um a três meses e que demonstra a presença do vírus, no organismo. Um pouco mais tarde (mas às vezes ao mesmo tempo) surge o antígeno HBe, sinónimo de que o agente infeccioso está a multiplicar-se. É nesta fase que é mais elevado o perigo de contágio. Só depois surgem os anticorpos e o primeiro a aparecer, em geral, é o anti-HBc. Em seguida, se as defesas imunitárias do organismo estiverem a funcionar corretamente, surgem o anti-HBe, como resposta ao antígeno HBe. Isto significa que houve uma seroconversão, a multiplicação do vírus diminuiu e, se nada alterar o curso normal, desaparece o antígeno HBs e surge o anticorpo anti-HBs, que permanece no organismo para o resto da vida e confere imunidade. A presença do antígeno HBe, além das oito semanas, indica que a hepatite está a passar a uma fase crónica. A permanência do antígeno HBs, por mais de seis meses confirma a passagem ao estágio crónico.

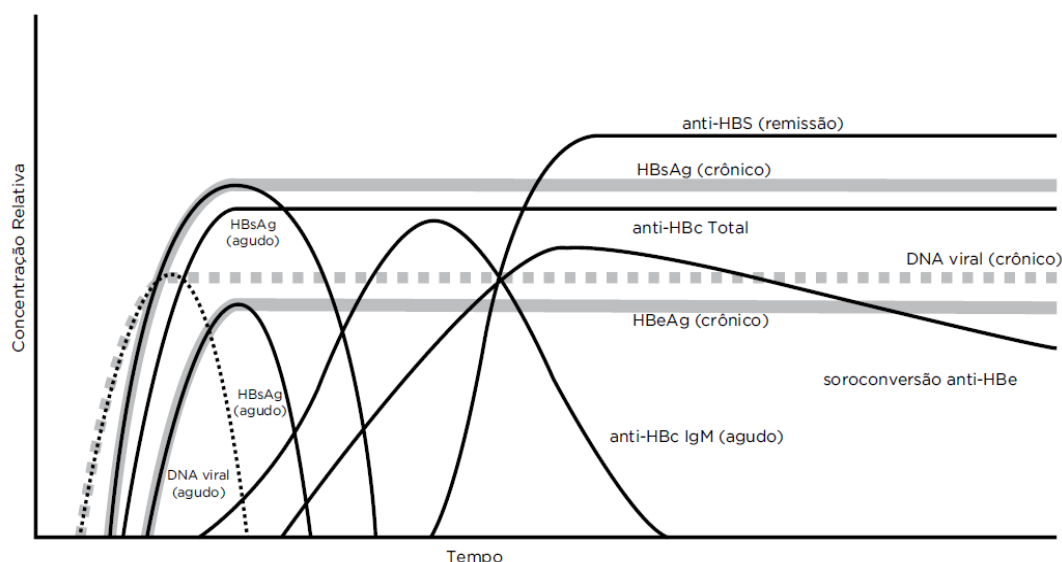


Figura 10 - Evolução dos marcadores do vírus da hepatite B (HBV) nas infecções agudas e crônicas.

Na Hepatite C, a infecção pelo vírus conduz, frequentemente, a hepatite crônica e cirrose. Anticorpos anti-HCV são produzidos em resposta ao vírus da hepatite C e, por isso, quando positivos podem ser indicativos de infecção.

Diagnóstico de SIDA

HIV é responsável pela SIDA, que, como o nome indica, é um síndrome caracterizado pela deterioração progressiva do sistema imunitário, o que propicia o desenvolvimento de infecções oportunistas e câncros potencialmente mortais. Anticorpos anti-HIV IgM e IgG são determinados por imunoenaios de micropartículas por quimioluminescência, e os resultados positivos confirmados por tecnologia ELFA.[27]

4.4 Fase pós-analítica

Quando concluído o processamento das amostras, os resultados são sujeitos a validação biopatológica pelo técnico superior especialista responsável. É, no entanto, importante ter em consideração que este processamento é complexo e segue um determinado fluxograma, sendo o passo seguinte da cadeia dependente do resultado do passo anterior. A validação biopatológica resulta do conjunto de ações desenvolvidas ao longo de todo o processo de forma a conduzir à identificação do(s) microrganismo(s) realmente causador(s) de infecção.

5 Controlo de Qualidade

O controlo de Qualidade permite avaliar o desempenho quer dos auto-analisadores, quer dos reagentes dos mesmos, bem como dos procedimentos efetuados por parte dos técnicos de saúde, ajudando a detetar não conformidades ou a validar procedimentos, isto é, ajuda a perceber se existe algum problema a nível técnico ou a nível do processamento da amostra, podendo proceder a medidas corretivas caso necessário. O controlo de qualidade pode ser dividido em controlo interno e controlo externo.

O controlo de qualidade interno utiliza amostras conhecidas e permite avaliar a precisão de todos os procedimentos, isto é, o desempenho diário dos equipamentos, e deve ser realizado antes do início de cada sessão de trabalho, e cada vez que se proceda à alteração das condições de trabalho, como mudança de lote de reagentes ou determinadas manutenções dos equipamentos. De modo a interpretar os resultados obtidos aquando da realização do controlo interno, são construídas cartas de Levey-Jennings que são avaliadas de acordo com as regras de Westgard tendo em conta os desvios-padrão da média e o erro total admissível.

O Controlo de Qualidade Externo utiliza amostras desconhecidas, avalia a exatidão dos resultados e é realizado através de vários programas, o UK NEQAS, o LabQuality e o INSTAND, que permitem a avaliação do desempenho laboratorial do Hospital Sousa Martins. As amostras recebidas são processadas nas mesmas condições das amostras dos pacientes, e os resultados são enviados posteriormente para a entidade referida. Esta avalia os resultados obtidos, procede ao seu tratamento estatístico e compara-os com os laboratórios também integrados neste programa.

Em relação às calibrações das técnicas dos equipamentos, estas têm como fim garantir a exatidão das técnicas efetuadas, e são realizadas tendo em conta determinados requisitos, por exemplo, quando os valores do controlo de qualidade interno se encontram fora dos valores de referência, quando o prazo de validade do calibrador expirou, quando há mudança de lote de reagentes, após a manutenção dos equipamentos, etc.

6 Conclusão

As análises clínicas são um dos mais importantes meios de diagnóstico complementares pois permitem, através da recolha de materiais biológicos como urina, sangue, fezes, saliva ou outros tecidos, diagnosticar anomalias, patologias ou doenças, uma vez que as doenças se manifestam através de alterações analíticas que enquadradas com a clínica permitem tirar conclusões acerca do estado de saúde do doente.

É uma área pluridisciplinar e, por isso, o estudo das doenças tem de ser feito integrando o estudo de cada setor num todo.

É importante não esquecer, que os Laboratórios de Análises Clínicas são estruturas muito complexas, cujo funcionamento exige a aquisição de equipamentos muito dispendiosos, a contratação de pessoal qualificado, o cumprimento de normas de instalação e funcionamento igualmente complexas, e a implementação de um sistema da qualidade específico.

Este estágio foi essencial para a integração na prática laboratorial dos conhecimentos teóricos, adquiridos no decorrer do Mestrado em Análises Clínicas.

7 Referências Bibliográficas

- [1] “Unidade Local de Saúde de Guarda - Página inicial.” [Online]. Available: <http://www.ulsguarda.min-saude.pt/>. [Accessed: 28-Jun-2018].
- [2] “Serviços de Apoio Categoria - Unidade Local de Saúde de Guarda.” [Online]. Available: <http://www.ulsguarda.min-saude.pt/category/servicos/servicos-apoio/>. [Accessed: 28-Jun-2018].
- [3] D. Boyd and C. Hawker, “Automation in the Clinical Laboratory,” in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 5th ed., C. Burtis, E. Ashwood, and D. Bruns, Eds. Elsevier, pp. 475–477, 2012.
- [4] J. C. Ayus and C. Caramelo, *Agua, electrolitos y equilibrio ácido-base: aprendizaje mediante casos clínicos*. Ed. Médica Panamericana, 2006.
- [5] J. Wallach, “Analitos Sanguíneos Principais,” in *interpretação de Exames Laboratoriais*, 8th ed., J. Wallach, Ed. Guanabara Koogan, pp. 42–108, 2009.
- [6] G. Pocock and C. Richards, “Sistema Digestório,” in *Fisiologia Humana*, G. Pocock and C. Richards, Eds. Guanabara Koogan, pp. 423–432, 2006.
- [7] Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines, “IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis,” *Pancreatology*, vol. 13, no. 4, pp. e1–e15, 2013.
- [8] Direção-Geral da Saúde, “Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus,” *Norma da Direção Geral da Saúde*, 2011, pp. 1–13, 2011.
- [9] Direção-Geral da Saúde, “Diagnóstico e conduta na Diabetes Gestacional,” *Norma da DGS*, no. Diabetes, pp. 1–7, 2011.
- [10] G. Pocock and C. Richards, “O Rim e a Regulação do Meio Interno,” in *Fisiologia Humana*, 2nd ed., G. Pocock and C. Richards, Eds. Guanabara Koogan, pp. 369–397, 2006.
- [11] G. Lopez, N. Mendiola, M. Dominguez, and M. Yague, “Alteraciones de la función renal,” in *Manual de Medicina de Laratorio para Atención Primária*, R. Rodriguez and L. Mateos, Eds. AEBM-ML, pp. 139–153, 2017.
- [12] I. C. Gabriel, S. K. Nishida, and G. M. Kirsztajn, “Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal?,” *J Bras Nefrol*, vol. 33, pp. 261–267, 2011.
- [13] R. Corcuera, C. Flocco, Nicola, and P. Paredes, “Dislipidemias,” in *Manual de Medicina de Laratorio para Atención Primária*, R. Rodriguez and L. Mateos, Eds. AEBM-ML, pp. 139–153, 2017.
- [14] M. Beatriz and A. C. Latronico, “O Papel dos Receptores das GN na Reprodução Feminina,” *Arq Bras Endocrinol Metab*, vol. 45, pp. 369–374, 2001.
- [15] J. Ansoain and A. Uche, “Alteraciones de la Función Tiroidea,” in *Manual de Medicina de Laratorio para Atención Primária*, R. Rodriguez and L. Mateos, Eds. AEBM-ML, pp. 195–215, 2017.
- [16] J. Wallach, “Doenças Endócrinas,” in *interpretação de Exames Laboratoriais*, 8th ed., J. Wallach, Ed. Guanabara Koogan, pp. 821–856, 2007.
- [17] J. W. M.D., *Interpretação de Exames Laboratoriais*, Oitava. Editora Guanabara Koogan S.A, 2009.
- [18] J. Wallach, “Hematologia,” in *Interpretação de Exames Laboratoriais*, 8th ed., J. Wallach, Ed. Guanabara Koogan, 2007.
- [19] J. METZ, “Folates in megaloblastic anaemia.,” *Bull. World Health Organ.*, vol. 28, pp. 517–529, 1963.
- [20] S. Henriques, Ma. Lélis, H. Jesus, and J. N. Araújo, “Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas,” *Med. Interna Rev. DA Soc. Port. Med. INTERNA*, vol. 13, pp. 113–125.

- [21] C. Snozeke, G. McMillin, and T. Moyer, “Therapeutic Drugs and Their Management,” in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 5th ed., C. Burtis, R. Ashwood, and D. Bruns, Eds. Elsevier, pp. 1057–1108, 2012.
- [22] P. Murray, K. Rosenthal, and M. Pfaller, “Microbiota Comensal e Patogênica no Homem,” in *Microbiologia Médica*, 5th ed., P. Murray, K. Rosenthal, and M. Pfaller, Eds. Elsevier Editora Ltda., pp. 81–84, 2006.
- [23] A. Fonseca, C. Sebastião, F. Martins, F. Ribeiro, and M. Carvalho, “Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas Laboratoriais em Bacteriologia.” Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI) - Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA), 2004.
- [24] P. Murray, K. Rosenthal, and M. Pfaller, “Diagnóstico Laboratorial de Doenças Bacterianas,” in *Microbiologia Médica*, 5th ed., P. Murray, K. Rosenthal, and M. Pfaller, Eds. Elsevier Editora Ltda., 2006, pp. 207–2013.
- [25] M. Janier¹ et al., “2014 European Guideline on the Management of Syphilis.”
- [26] K. Macsween and D. Crawford, “Epstein-Barr virus – recent advances.,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 3, pp. 131–140, 2003.
- [27] H. M. George, “Diagnóstico e Rastreamento Laboratorial da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana,” *Direção Geral da Saúde*, pp. 1–4, 2011.