



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bárbara Inês Henriques Tavares de Figueiredo

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e Dra. Cristiana Canha, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bárbara Inês Henriques Tavares de Figueiredo

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e Dra. Cristiana Canha, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra entre janeiro e junho de 2021, englobando as valências de Imunologia, Hematologia, Bioquímica e Microbiologia.

Outubro de 2021

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Fernando Rodrigues, a possibilidade de realizar o meu estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica do CHUC.

Agradeço à Dra. Cristiana Canha e Dra. Alice Mendes por me transmitirem os seus conhecimentos, por estarem sempre disponíveis para me ajudar e por me orientarem durante o estágio.

Agradeço à Professora Doutora Ana Miguel Matos, Coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas e minha orientadora interna, pela disponibilidade e apoio ao longo destes dois anos.

Desejo agradecer também a todos os Professores com quem me cruzei ao longo do mestrado, por tudo o que me ensinaram.

Agradeço a todos os meus colegas de mestrado por partilharem comigo estes dois anos, especialmente à minha colega de estágio, Patrícia.

Agradeço a todos os amigos que Coimbra me deu, principalmente Mica, Adriana, Inês, Margarida, Carol e Maggie. Do mesmo modo, quero agradecer aos meus amigos de sempre, grupinho de Sever e Martinha.

Um agradecimento especial ao meu melhor amigo e namorado, Tiago, por toda a compreensão, amor e dedicação. Obrigada por sempre acreditares nas minhas capacidades, e por me apoiares incondicionalmente ao longo destes anos.

Agradeço à minha irmã, Bruna, por ser um grande apoio em tudo ao longo da minha vida. És a minha inspiração!

Por fim, quero agradecer aos meus pais por tudo! Obrigada por estarem sempre ao meu lado, por sempre acreditarem em mim e por me darem oportunidade de realizar os meus sonhos.

Índice

Abreviaturas.....	VII
Sumário.....	IX
Abstract.....	IX
1. Introdução.....	1
2. Caracterização do laboratório.....	1
3. Amostras biológicas.....	3
3.1. Fluxo das amostras.....	3
4. Controlo de qualidade.....	4
4.1. Controlo de qualidade interno.....	4
4.2. Controlo de qualidade externo.....	5
5. Imunologia.....	5
6. Hematologia.....	6
7. Bioquímica.....	7
7.1. Parâmetros Bioquímicos.....	9
7.1.1. Avaliação da função renal.....	9
7.1.2. Avaliação do equilíbrio hidro-eletrolítico.....	15
7.1.3. Avaliação da função hepato-biliar.....	17
7.1.4. Avaliação do perfil lipídico.....	24
7.1.5. Avaliação da função cardíaca.....	26
7.1.6. Outros doseamentos.....	29
8. Microbiologia.....	31
8.1. Bacteriologia.....	31
8.1.1. Exame microscópico.....	31
8.1.2. Exame cultural.....	32
8.1.3. Identificação.....	36
8.1.4. Teste de Suscetibilidades aos Antimicrobianos.....	36
8.1.5. Amostras biológicas.....	38
1. Urina.....	38
2. Fezes.....	39
3. Sangue.....	40
4. Produtos do trato respiratório.....	41
5. Exsudados vaginais e exsudados uretrais.....	43
6. Exsudados de feridas, aspirados e exsudados profundos.....	43
7. Líquido Cefalorraquidiano.....	44
8. Outros líquidos.....	44
9. Cateter.....	45
8.2. Micobactérias.....	45
8.2.1. Processamento das amostras.....	46
8.2.2. Exame microscópico.....	47
8.2.3. Exame cultural.....	47
8.2.4. Antibiograma para micobactérias.....	48
8.3. Parasitologia.....	48
8.4. Micologia.....	49
8.5. Virologia.....	50
8.6. Técnicas de biologia molecular.....	51
8.7. Serologia.....	52

8.7.1. Métodos de Serologia.....	52
9. Casos Clínicos.....	55
Caso clínico 1.....	55
Caso clínico 2.....	56
10. Conclusão.....	58
Referências.....	59
ANEXOS.....	I

Índice de Tabelas

Tabela I: Parâmetros da análise sumária da urina e respectivos significados clínicos.....	12
Tabela II: Elementos observados no sedimento urinário e respectivo significado clínico.....	13
Tabela III: Causas de hiperbilirrubinemia não conjugada e hiperbilirrubinemia conjugada.	21
Tabela IV: Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do HUC.	33
Tabela V: Classificação da avaliação semi-quantitativa das uroculturas.....	39
Tabela VI: Classificação da avaliação do exame microscópico das amostras respiratórias.	42
Tabela VII: Características das diferentes lipoproteínas.	V
Tabela VIII: Painéis de antibióticos utilizados no MicroScan WalkAway (TSA automático), de acordo com os microrganismos.....	V
Tabela IX: Análises efetuadas na admissão hospitalar.	VII
Tabela X: Análises serológicas.....	VIII
Tabela XI: Resultados obtidos por FilmArray (Painel Gastrointestinal)	VIII
Tabela XII: Análises bioquímicas e citológicas do LCR.	IX
Tabela XIII: Resultados obtidos por FilmArray (Painel meningite/encefalite)	IX

Índice de Figuras

Figura 1: Representação de um proteinograma.....	6
Figura 2: Representação esquemática do metabolismo da bilirrubina.....	20
Figura 3: Representação esquemática da técnica de inoculação por (A) esgotamento do produto e por (B) sementeira semi-quantitativa. (Adaptado de Tille P., 2017)	35
Figura 4: A) Gametócito de Plasmodium falciparum; B) Trofozoíto de Plasmodium falciparum; C) Trofozoíto de Plasmodium vivax; D) Trofozoíto de Plasmodium ovale.....	49
Figura 5: Exame microscópico do LCR. Observaram-se bacilos Gram positivo, sugestivos de Listeria Monocytogenes.	57
Figura *: Crescimento bacteriano em cultura de GS.	57
Figura 7: Antibiograma em disco para Listeria monocytogenes.....	57

Abreviaturas

ALP – Fosfatase Alcalina
ALT – Alanina Aminotransferase
ApoA₁ – Apolipoproteína A I
ApoB₁₀₀ – Apolipoproteína B₁₀₀
AST – Aspartato Aminotransferase
BAAR – Bacilos ácido-álcool resistentes
BCSA – meio de cultura para *Burkholderia cepacia*
BHI – meio de cultura *Brain Heart Infusion*
BNP – peptídeo natriurético tipo B
CAM – Gelose para *Campylobacter* spp.
CBGN – Caldo para Bacilos Gram negativo
CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CIN – meio de cultura com cefsulodina-irgasan-novobiocina
CK – creatina cinase
CK-MB – creatina cinase isoforma MB
CLED – meio de cultura com cistina, lactose e deficiente em eletrólitos
CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute
CM – Cooked Meat
CMI – Concentração mínima inibitória
CNA – Agar Columbia com colistina e ácido nalidíxico
CQE – Controlo Externo de Qualidade
CQI – Controlo Interno de Qualidade
cTn – troponina cardíaca
cTnI – troponina I cardíaca
cTnT – troponina T cardíaca
DCV – Doença Cardiovascular
DNA – ácido desoxirribonucleico
DST – Doença sexualmente transmissível
EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio
EDTA – ácido etileno-diamino tetra-acético
ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática
EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FISH – Fluorescent In Situ Hybridization
FQ – Fibrose Quística
GGT – Gama-glutamyltransferase
GI – Gastrointestinal
GN – Gram negativo
GP – Gram positivo
GS – Gelose de Sangue
HAE – meio para *Haemophilus* spp.
HbA_{1c} – Hemoglobina glicada
HC – Hepatite C
HDL – lipoproteína de alta densidade

HG – Hospital Geral
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HP – Hospital Pediátrico
hs-cTnI – Troponina I cardíaca de alta sensibilidade
hs-cTnT – Troponina T cardíaca de alta sensibilidade
hs-PCR – Proteína C reativa de alta sensibilidade
HUC – Hospital Universitário de Coimbra
IDL – lipoproteína de densidade intermédia
IFI – imunofluorescência indireta
Ig – Imunoglobulina
ITU – Infecção do Trato Urinário
KV – meio de cultura Kanamicina e Vancomicina
LBA – Lavado bronco-alveolar
LCR – Líquido cefalorraquidiano
LJ – meio Löwenstein-Jensen
MGIT – Mycobacterium Growth Indicator Tube
MH – Muller-Hinton
MH-F – Muller-Hinton chocolate
NALC – N-acetil-L-cisteína
NE – meio para bactérias anaeróbicas não esporuladas
NT-proBNP – porção N-terminal do pro-BNP
PANTA – polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina
PCR – Polymerase Chain Reaction
PCR – Proteína C Reativa
PTGO – Prova de tolerância à glucose oral
PVX – meio de PoliViteX
RNA – ácido ribonucleico
RPR – rapid plasma reagin
RT-PCR – Polymerase Chain Reaction com Transcriptase Reversa
SCH – meio de cultura Schaedler
SGC2 – meio de cultura Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol
SMAC – meio de cultura MacConkey com sorbitol
SNC – sistema nervoso central
SS – meio de cultura para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.
TFG – Taxa de filtração glomerular
TG – Triglicéridos
TSA – Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
TSA – Trypticase de soja
TSS – Trypticase de soja com 5% de sangue carneiro
VCAT – meio de cultura para *Neisseria* spp.
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

Sumário

O presente relatório tem como finalidade descrever a experiência do estágio realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Este relatório aborda as metodologias, os parâmetros mais solicitados e os diferentes procedimentos para cada tipo de amostra, bem como o controlo de qualidade implementado no laboratório. Apesar do estágio ter abrangido todas as valências de um laboratório de análises clínicas, este relatório tem uma abordagem mais detalhada sobre as áreas de Bioquímica e Microbiologia. Além disso, são apresentados dois casos clínicos, de modo a evidenciar a importância das análises clínicas no diagnóstico.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Patologia Clínica, Bioquímica Clínica, Microbiologia, Diagnóstico Laboratorial

Abstract

The aim of this report is to describe the experience of the internship carried out at the Hospital and University Center of Coimbra (CHUC), under the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy from University of Coimbra.

This report describes the methodologies, the most requested parameters and the different procedures for each type of sample, as well as the quality control implemented in the laboratory. Although the internship covered all the valences of a clinical analysis laboratory, this report has a more in-depth approach to the areas of Biochemistry and Microbiology. In addition, two clinical cases are presented, in order to highlight the importance of clinical analysis in diagnosis.

Keywords: Clinical Analysis, Clinical Pathology, Clinical Biochemistry, Microbiology, Laboratory Diagnosis

I. Introdução

As análises clínicas são uma área multidisciplinar essencial para o diagnóstico, monitorização e eleição do tratamento da patologia. A análise laboratorial de uma amostra biológica permite complementar a avaliação do estado de saúde de cada paciente.

A área da saúde está em evolução contínua, repleta de desafios, o que obriga os seus intervenientes a uma atualização constante. Posto isto, considero que o Mestrado em Análises Clínicas é adequado para satisfazer as dificuldades propostas do mundo atual, pois aborda todas as áreas de trabalho de um laboratório de análises clínicas e além disso, oferece a realização de um estágio, de modo a integrar a teoria das áreas lecionadas anteriormente com a atividade laboratorial, tanto técnica e operacional como na validação analítica dos resultados.

O estágio foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) num período compreendido entre janeiro e junho de 2021.

Neste relatório serão abordadas todas as áreas do estágio (Imunologia, Hematologia, Bioquímica Clínica e Microbiologia). As valências de Bioquímica e Microbiologia serão as mais aprofundadas. No final serão apresentados dois casos clínicos com o objetivo de colocar em prática e explicar tudo o que aprendi ao longo do mestrado e essencialmente durante o estágio curricular.

2. Caracterização do laboratório

O Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) está dividido em 3 unidades hospitalares: Hospital Universitário de Coimbra (HUC), Hospital Pediátrico (HP) e Hospital Geral (HG). O estágio decorreu maioritariamente no laboratório principal, localizado no edifício de São Jerónimo do HUC e, parcialmente no laboratório do HP.

Os produtos biológicos podem ser transportados entre as 3 instituições hospitalares, de modo a realizar as análises no laboratório mais especializado. Além disso, o laboratório recebe amostras provenientes do HP, HG, Maternidade Daniel de Matos, Maternidade Bissaya Barreto, Hospital Sobral Cid e outras unidades de saúde da zona centro, sendo que o CHUC é um hospital central de referência. No entanto, também são enviadas amostras para o exterior quando são análises que o CHUC não realiza, podendo ser enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), entre outros, incluindo laboratórios no estrangeiro.

O Diretor do Serviço de Patologia Clínica é o Dr. Fernando Rodrigues, e os recursos humanos são constituídos por médicos especialistas em Patologia Clínica, Farmacêuticos,

Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, Assistentes Técnicos e Assistentes Operacionais. Esta equipa multidisciplinar garante o bom funcionamento deste serviço.

O laboratório principal é constituído pela sala de colheitas, área de receção de produtos biológicos, CoreLab, salas de apoio dos diferentes setores e respetivos gabinetes de validação, áreas administrativas e áreas de armazenamento.

O laboratório apresenta-se setorizado em 4 áreas principais: Microbiologia, Imunologia, Hematologia e Bioquímica Clínica, sendo que as duas últimas estão inseridas maioritariamente no CoreLab. Este espaço é composto por uma cadeia automatizada e vários aparelhos interligados entre si, que possibilitam a integração das amostras na cadeia e respetiva distribuição pelos equipamentos de acordo com os parâmetros analíticos solicitados. Esta inovação do CoreLab contribui para a diminuição de erros associados à fase pré-analítica e diminui o tempo de resposta. A automatização do laboratório permite uma gestão automática das amostras e ainda o seu escoamento pelos diversos equipamentos utilizados para o seu processamento e armazenamento. O CoreLab funciona 24h por dia, todos os dias, assegurando o serviço de urgência do CHUC. Os setores de bioquímica clínica e hematologia funcionam maioritariamente no CoreLab, mas também apresentam laboratórios individualizados e gabinetes de apoio para validação. O setor de imunologia é constituído por duas áreas, “autoimunidade” e “imunologia e alergologia”, com dois gabinetes de validação e duas salas de trabalho.

As amostras biológicas provenientes da sala de colheitas, das outras instituições ou dos Serviços de Internamento (através da via do pneumático) quando chegam à zona de receção de amostras são integradas no sistema informático Clinidata XXI e posteriormente inseridas na cadeia automática ou entregues em mão, especialmente no setor de microbiologia.

O sistema informático permite acompanhar todo o processo de uma amostra biológica, desde a requisição solicitada pelo médico até ao resultado obtido das análises pedidas. O sistema Clinidata XXI possibilita rastrear a amostra, visualizar o histórico do paciente e a informação clínica disponibilizada pelo clínico, elaborar listas de trabalho, identificar pedidos em duplicado, visualizar e validar os resultados de cada parâmetro analítico.

A informatização permite uma comunicação direta entre os equipamentos e o sistema informático. Desta forma, possibilita uma gestão laboratorial mais intuitiva e mais rápida, minimizando os erros, o que aumenta a rentabilidade e a confiança nos resultados.

3. Amostras biológicas

As amostras biológicas recebidas no laboratório englobam sangue, urina, fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros líquidos biológicos (sinovial, pleural, peritoneal). As amostras para microbiologia serão abordadas mais à frente no presente relatório.

As amostras de soro são colhidas para tubos com gel ativador da coagulação a partir das quais após centrifugação (10min 3000 rpm) se obtém o soro, que é utilizado na análise de parâmetros das áreas de bioquímica, imunologia, serologia e hormonologia.

Na análise hematológica é utilizado o tubo com ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA) K₃ como anticoagulante para que seja utilizado o sangue total para a determinação do hemograma e velocidade de sedimentação. Este tubo também é utilizado para algumas análises de bioquímica clínica, nomeadamente hemoglobina glicada e peptídeo natriurético tipo B (BNP). O estudo das provas de coagulação necessita de colheita para um tubo com citrato de sódio a 3,2%, que após a centrifugação (15min 3000 rpm) permite a obtenção do plasma. Os anticoagulantes mais frequentes são o EDTA e o citrato de sódio, que são quelantes dos iões de cálcio e assim impedem a coagulação.

A colheita das amostras deve garantir o protocolo de boas práticas laboratoriais, tendo em atenção a quantidade de volume de sangue no caso dos tubos com anticoagulantes, pois é importante respeitar a relação anticoagulante/amostra, de modo que o anticoagulante seja suficiente para a quantidade de sangue. Além disso, também é crucial que a colheita de sangue seja feita por uma ordem específica, de modo a evitar contaminações e falsear resultados. Desta forma, a colheita para análise microbiológica deverá ser a primeira colheita (se assim for requerido), seguindo-se o tubo de gel, tubo com citrato de sódio e por último o tubo com EDTA. A colheita das amostras é um dos momentos mais suscetíveis à ocorrência de erros pré-analíticos, pelo que devem ser seguidas as recomendações descritas no manual de colheitas do laboratório. Deste modo, será possível minimizar situações que podem adulterar os valores analíticos, como por exemplo a hemólise.

3.1. Fluxo das amostras

A colheita é realizada de acordo com a prescrição médica efetuada pelo clínico, que solicita os parâmetros mais pertinentes a analisar. Após a devida identificação e a colheita, as amostras são enviadas para o Serviço de Patologia Clínica devidamente acondicionadas, este transporte também deve ser efetuado sob as condições ideais perante os parâmetros solicitados. Na zona de receção de amostras são avaliadas as condições das mesmas e verifica-se se estão devidamente identificadas e conforme os requisitos. Caso todos requisitos necessários

estejam em conformidade, as amostras são integradas no sistema informático e avançam para análise dos parâmetros solicitados. O processamento das amostras pode englobar a centrifugação, a realização de alíquotas ou outros processos laboratoriais. Após a preparação da amostra procede-se à análise da amostra propriamente dita. Se a amostra estiver conforme, os controlos internos estiverem dentro dos limites aceitáveis e se o valor for compatível com a clínica, o resultado é validado.

4. Controlo de qualidade

Na maioria das situações o diagnóstico e a terapêutica são baseados nos resultados laboratoriais, sendo por isso necessário garantir confiança e qualidade nos valores analíticos obtidos.

A garantia de qualidade de um produto ou serviço assegura a satisfação das necessidades exigidas através de ações e procedimentos que garantem a manutenção das mesmas. Desta forma, a garantia de qualidade laboratorial consiste na certificação da exatidão e precisão dos resultados, de modo a aumentar o nível de confiança dos resultados obtidos e que estes sejam fidedignos.

O controlo de qualidade é crucial na avaliação do funcionamento e dos métodos de trabalho do laboratório, permitindo identificar possíveis falhas e contribuir para a melhoria contínua dos processos laboratoriais. Um erro laboratorial pode comprometer o diagnóstico ou a terapêutica destes, bem como levar a gastos monetários que poderiam ser evitados. O facto da fase pré-analítica estar mais sujeita à intervenção humana, associado a uma maior dificuldade em aplicar controlos de qualidade, dificulta o controlo, levando a uma maior probabilidade de ocorrência de erros.

4.1. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno (CQI) consiste na verificação da qualidade do próprio laboratório. Na fase analítica, o CQI é responsável pela avaliação da precisão do método nos equipamentos. Nesse caso são utilizadas amostras controlo com valores previamente conhecidos em vários níveis: nível 1 (normal), nível 2 (nível patológico baixo) e nível 3 (nível patológico elevado). Conforme a avaliação dos resultados obtidos são construídas cartas de controlo (gráfico de Levey-Jennings) onde é avaliada a imprecisão do teste, de acordo com as regras de Westgard. Caso o resultado obtido da amostra controlo não permaneça dentro do intervalo de confiança esperado, é indicativo da ocorrência de erro e torna-se imperativa a sua correção. As medidas corretivas passam pela implementação de ações de correção, que consistem em calibrações, alteração do reagente ou consumíveis, ou alteração do próprio

controle, pois este pode sofrer alterações ao longo do tempo. Além disso, é necessário calibrar o aparelho sempre que há introdução de um novo lote de reagente ou consumível. É importante também, assegurar as manutenções diárias e semanais dos equipamentos para garantir que estes se apresentam em condições ideais de trabalho, de modo a facultar-nos valores fidedignos.

4.2. Controle de qualidade externo

O controle de qualidade externo (CQE) consiste numa avaliação inter-laboratorial, ou seja, compara o desempenho do nosso laboratório com o desempenho de outros laboratórios. Desta forma, permite uma avaliação da exatidão e precisão dos métodos. A avaliação da qualidade externa consiste na análise de amostras desconhecidas enviadas por entidades de referência. Esta amostra deve ser tratada como uma amostra dos pacientes, de modo a refletir exatamente a rotina do laboratório. Os resultados obtidos da amostra desconhecida são enviados em forma de relatório para os laboratórios de referência, e estes comparam os resultados de todos os laboratórios participantes nesse controle externo de qualidade. Esta comparação pode ser feita entre diferentes laboratórios que utilizem o mesmo método ou aparelho, ou de uma forma geral, comparando apenas o resultado final obtido, independentemente dos métodos ou aparelhos utilizados. Assim sendo, possibilita uma comparação generalizada entre todos os laboratórios sujeitos ao programa de controle de qualidade externo. O Serviço de Patologia Clínica integra vários programas de CQE, nomeadamente NEQAS, RIQAS, Bio-Rad, entre outros.

5. Imunologia

A área de imunologia dedica-se ao estudo dos distúrbios do sistema imunológico, como no caso das doenças autoimunes e das reações alérgicas. No setor de imunologia, as metodologias utilizadas baseiam-se em reações antígeno-anticorpo. O Anexo I resume as técnicas utilizadas e os respetivos parâmetros analisados. O tipo de amostra mais utilizada é o soro, no entanto, também podem ser utilizadas amostras de urina, LCR e fezes. O setor de imunologia é constituído por dois laboratórios, “autoimunidade” e “imunologia e alergologia”.

As doenças autoimunes ocorrem quando o sistema imunológico perde a capacidade de tolerância ao próprio organismo, produzindo anticorpos contra autoantígenos. Desta forma, a “autoimunidade” dedica-se à pesquisa de autoanticorpos, o que permite diagnosticar e monitorizar as doenças autoimunes. A determinação dos autoanticorpos é feita essencialmente por métodos de imunofluorescência indireta (IFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e imunoenaios por quimioluminescência. Na pesquisa de

autoanticorpos pela técnica de IFI é considerada a intensidade de fluorescência e a complexidade dos padrões morfológicos formados pela reação dos autoanticorpos com os antígenos presentes nos diferentes constituintes celulares. Desta forma, é possível identificar o tipo de anticorpo presente na amostra e quantificar o respectivo título.

No laboratório de “imunologia e alergologia” as análises mais frequentes consistem na pesquisa e doseamento de imunoglobulinas (Ig). São realizados proteinogramas ou eletroforese de proteínas séricas (Figura 1), que permitem detetar alterações do perfil proteico. Quando surgem alterações na fração gama, realizam-se imunofixações, com o objetivo de separar e identificar os diferentes tipos de imunoglobulinas (cadeias pesadas: G, A, M, D, E; e cadeias leves: lambda e kappa), a fim de caracterizar a gamapatia. Este estudo é essencial no diagnóstico e monitorização de gamopatias monoclonais, como é o caso do Mieloma Múltiplo.

O estudo das doenças alérgicas é realizado pela pesquisa de IgE específica através de fluoroimunoensaio (FEIA).

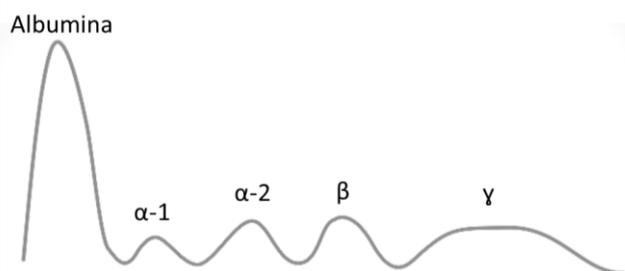


Figura 1: Representação de um proteinograma. (Adaptado de Burtis C., 2016)

6. Hematologia

A hematologia estuda os elementos constituintes do sangue e da medula óssea. As amostras de sangue total com EDTA são utilizadas para a realização do hemograma no analisador automático Sysmex XN-9000™, e a determinação da velocidade de sedimentação (VS) no equipamento Ves-Matic Cube 30. O hemograma inclui a quantificação dos glóbulos vermelhos e o cálculo dos índices eritrocitários (Volume Corpuscular Médio (MCV), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC), Distribuição do diâmetro eritrocitário (RDW) e Hematócrito). Além disso também engloba a contagem diferencial da população leucocitária (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos) e a contagem de plaquetas e reticulócitos. Qualquer alteração no hemograma necessita de uma análise mais detalhada e é feito um esfregaço sanguíneo, corado pela técnica de May-Grunwald-Giemsa para posterior observação ao microscópio.

O setor de hematologia inclui, também, a área da hemostase, responsável pelo estudo da coagulação, onde são utilizadas amostras de plasma obtidas após centrifugação do sangue colhido em citrato de sódio, sendo importante respeitar a proporção de 1/9 (volume de citrato de sódio/volume de sangue). As provas de coagulação mais solicitadas são realizadas no equipamento ACL TOP 700. Os testes de rotina realizados no estudo da hemostase incluem o Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (aPTT), doseamento de D-dímeros e fibrinogénio.

No laboratório do HUC, o setor de hematologia contém também o sub-setor de citogenética, que permite o diagnóstico e prognóstico de patologias hemato-oncológicas. Após um pré-tratamento das amostras de medula óssea ou sangue periférico, são realizadas análises de citogenética convencional, como o cariótipo, e citogenética molecular, como a técnica de *fluorescent in situ hybridization* (FISH), permitindo identificar alterações cromossômicas associadas a doenças hemato-oncológicas.

7. Bioquímica

Em química analítica a maioria das determinações são feitas no soro e na urina, e em menor quantidade nas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros líquidos biológicos (sinovial, pleural, pleritoneal). A maioria das amostras de soro são colhidas em tubos de gel, e neste caso após a colheita de sangue e retração do coágulo é necessário preparar a amostra. A preparação consiste na centrifugação das amostras a 3000rpm durante 15min. Pode, também, ser usado o tubo de sangue com EDTA para a determinação da hemoglobina glicada e o doseamento dos peptídeos natriuréticos.

A maioria das amostras para análise no setor de bioquímica é processada no CoreLab, nos equipamentos inseridos na cadeia. Contudo, alguns parâmetros são feitos nas salas de apoio do setor de bioquímica. Nessas salas individualizadas são feitas análises de urina, pesquisa de sangue oculto nas fezes, análise da composição de cálculos e determinações solicitadas com menos frequência, como o doseamento de metais pesados, fármacos e outras substâncias. Estes parâmetros não são realizados todos os dias, assim sendo, as amostras que não são analisadas no próprio dia, são aliqüotadas para congelação, de forma a manter a viabilidade das mesmas, e garantir bons resultados quando forem feitas as determinações.

O meu estágio também incluiu uma semana no laboratório do HP no setor de bioquímica clínica, onde foi possível ver algumas diferenças significativas em comparação com o laboratório do HUC. No HP há grande variedade de tamanhos de tubos de colheita para ajustar o volume da amostra ao tamanho da criança, tendo em conta que a população pediátrica tem, por norma, uma colheita mais difícil e por vezes a amostra pode ser muito

escassa. Além disso, há certos parâmetros mais frequentemente avaliados em pediatria, com os quais tive oportunidade de me familiarizar, sendo um desses exemplos a amônia. Também tive oportunidade de presenciar toda a realização do teste de suor, desde a colheita ao seu processamento. A colheita de suor feita na pele do pulso é analisada para a determinação da condutividade e da colometria para determinar a concentração de NaCl e Cloreto no suor, respectivamente. Este tipo de teste pode ser realizado na suspeita de Fibrose Quística (FQ) para complementar o seu diagnóstico. A FQ é caracterizada pela dificuldade de secreção de fluídos pelas glândulas, e por isso um resultado superior ao valor de referência está associado à FQ.¹

A maioria das análises bioquímicas são feitas nos auto-analizadores da Abbott, os Alinity, cujos métodos utilizados nesses equipamentos irei descrever mais detalhadamente de seguida. Contudo, há muitos aparelhos utilizados para as determinações analíticas no setor de bioquímica, os quais refiro no Anexo II.

Alinity c (Abbott)

O equipamento da Abbott que permite a realização da maior parte das análises químicas em soro, urina e líquidos biológicos é o Alinity c. Este aparelho utiliza métodos de espectrofotometria, turbidimetria e potenciometria.

I. Espectrofotometria

A espectrofotometria consiste na medição da absorvância de luz de uma amostra. Um feixe de luz, com um determinado comprimento de onda, incide na amostra contida na cuvette, e na presença de compostos que absorvem a luz do comprimento de onda utilizado, há uma diminuição da intensidade de luz quando esta atinge o detetor. Desta forma, de acordo com a lei de Beer, é possível definir a concentração da substância, que é diretamente proporcional à absorvância de luz.²

II. Turbidimetria

A turbidimetria consiste na medição da diminuição da intensidade de luz, que resulta da dispersão de luz das partículas em suspensão na solução. Esta técnica calcula a relação entre a intensidade da luz dispersa e a luz incidente. A dispersão de luz resulta da interação das partículas em solução com a luz. Esta interação é influenciada por diversos fatores como a massa molecular, concentração e dimensões das partículas, distância entre origem do feixe de luz e a partícula, comprimento de onda e polarização da luz incidida.²

III. Potenciometria

A potenciometria é baseada no uso de eletrodos seletivos de íons para a medição da diferença de potencial elétrico numa célula eletroquímica. Desta forma, é possível medir a atividade iônica de uma espécie química da solução. A atividade iônica de uma substância correlaciona-se com a sua concentração.³

Alinity i (Abbott)

O aparelho da Abbott, Alinity i permite a realização de imunoenaios através de reações de quimioluminescência. Este equipamento é muito utilizado no setor de imunologia e no setor de bioquímica.

I. Quimioluminescência

Na quimioluminescência, a emissão de luz ocorre como resultado de um processo de excitação induzido por uma reação química. Esta reação química envolve a oxidação de um composto orgânico. O Alinity i utiliza um imunoenaiio quimioluminescente com micropartículas (CMIA). Neste imunoenaiio, são utilizadas micropartículas magnéticas revestidas por anticorpos contra o antígeno, que neste caso é o analito de interesse. Na presença deste, formam-se imunocomplexos, que são revelados através da reação de quimioluminescência. Esta reação ocorre na presença de anticorpos marcados com compostos luminescentes, e por isso há emissão de luz. A intensidade de luz é diretamente proporcional à concentração da molécula de interesse presente na amostra.^{2;4;5}

7.1. Parâmetros Bioquímicos

O setor de bioquímica clínica é responsável pela determinação de parâmetros que possibilitam a avaliação funcional da grande maioria dos órgãos, além de também permitir acompanhar a evolução da doença e da monitorização da terapêutica. De seguida, abordo alguns dos parâmetros bioquímicos mais usualmente solicitados pelo clínico, e aqueles que são mais comuns na rotina laboratorial. Os parâmetros são apresentados integrados na sua utilidade clínica.

7.1.1. Avaliação da função renal

Os rins têm um papel muito importante na regulação da homeostase do organismo. A função renal engloba a filtração do sangue, excreção de produtos finais do metabolismo formando a urina, controlo da concentração do fluido extracelular e de vários íons, promovendo a homeostase eletrolítica e a regulação da água. Além disso, os rins também apresentam uma função endócrina, sendo responsáveis pela produção de hormonas como a

eritropoietina, a renina, as prostaglandinas e o calcitriol. Deste modo, a alteração da função renal pode conduzir a perturbações em todo o organismo.²

O rim é constituído por milhares de nefrónios, que são considerados a unidade funcional do rim. O nefrónio é composto pelo glomérulo, túbulos proximal e distal, ansa de Henle, e tubo coletor. Este sistema é irrigado por arteríolas e uma rede de capilares, que permitem a filtração, reabsorção e secreção do sangue para a produção de urina.²

A avaliação da função renal é feita através da medição de biomarcadores da função renal no soro e/ou na urina, e também da estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) e do cálculo da clearance de creatinina. Estes biomarcadores permitem diagnosticar, avaliar a evolução da doença renal ou monitorizar o seu tratamento.⁶

Azoto ureico

O catabolismo das proteínas e aminoácidos resultam na molécula de amónia, que é convertida em azoto ureico através de reações químicas catalisadas por enzimas do ciclo da ureia, no fígado. A excreção desta molécula é quase exclusivamente feita pelo rim, por isso a determinação de azoto ureico no soro é um biomarcador da função renal.²

A azoto ureico é eliminado por filtração glomerular, mas pode ser reabsorvido nos túbulos renais e retomar à corrente sanguínea. O aumento da concentração de azoto ureico no soro pode ser devido a diversos fatores, como uma dieta com elevado aporte de proteína, hemorragias gastrointestinais, aumento do catabolismo de proteínas, terapia com corticosteroides, desidratação ou qualquer fator que promova a diminuição da perfusão renal. Assim, uma situação de urémia pode ser indicativa de uma patologia renal.^{2,7}

A determinação simultânea do azoto ureico e da creatinina no soro é essencial a fim de calcular a razão azoto ureico/creatinina. Esta razão é fundamental para diferenciar a urémia pré-renal e pós-renal.²

Creatinina

A creatinina é uma substância resultante do metabolismo da creatina e da fosfocreatina no músculo esquelético. A creatinina é eliminada quase exclusivamente por filtração glomerular e não há reabsorção tubular, assim sendo, o doseamento da creatinina no soro é ideal para calcular a TFG.^{2,7}

A concentração sérica da creatinina é inversamente proporcional à TFG, contudo, uma leve diminuição da TFG pode não transpor para um aumento significativo de creatinina na corrente sanguínea. Assim como, um valor normal de creatinina sérica não traduz uma TFG normal, e por sua vez uma função renal normal. A fim de solucionar esta limitação, a avaliação da função

renal deve ser feita com base na clearance de creatinina e não no doseamento isolado da creatinina sérica.^{2,6}

Na prática clínica, o doseamento da creatinina no soro é muito usado para medição da função renal excretora, nomeadamente no cálculo da TFG.⁷

Clearance de Creatinina

A clearance consiste na quantidade de determinada substância no plasma, eliminada pelo rim, por unidade de tempo. Assim, considera-se que a quantidade da substância excretada na urina seja equivalente à filtração glomerular.⁸

A clearance de creatinina consiste num cálculo para avaliar a TFG, que requer o doseamento dos níveis de creatinina no soro e na urina, além da medição do volume de urina de 24h, como é representado na fórmula descrita em baixo.⁷

$$\text{Clearance de creatinina (mL/min)} = \frac{(\text{creatinina na urina (mg/dL)} \times \text{volume da urina de 24h (mL/min)})}{\text{creatinina no soro (mg/dL)}}$$

Taxa de filtração glomerular

A taxa de filtração glomerular (TFG) consiste num índice de avaliação da função renal, com o objetivo de aferir a quantidade de nefrónios funcionais. O filtrado glomerular é o produto obtido da filtração das moléculas pelo glomérulo, que depende da pressão hidrostática e da pressão oncótica na arteríola.² Desta forma, a determinação da TFG permite mensurar a capacidade funcional dos rins através de várias fórmulas, tendo por base o teste de clearance de creatinina e também outras variáveis como idade, raça, sexo, peso e altura.⁶ A equação de Cockcroft-Gault, apresentada em baixo, é uma das fórmulas utilizadas para o cálculo da TFG.⁹

$$TFG (ml/min) = \frac{[(140 - idade(anos)) \times peso(kg)]}{[72 \times creatinina \text{ no soro (mg/dl)}]} \times 0,85(mulheres)$$

Acido úrico

O ácido úrico deriva do catabolismo dos nucleosídeos de purina. Este composto é eliminado do organismo por via renal através de um processo de filtração glomerular, seguido de reabsorção tubular e posterior secreção. O seu doseamento é importante para diagnóstico e monitorização de várias patologias renais, neurológicas e gota.²

A hiperuricémia pode ocorrer devido ao aumento da síntese ou da ingestão de purinas, ou devido à diminuição da excreção que pode ser consequência de uma falha renal. Por outro lado, a diminuição da concentração sérica de ácido úrico, hipouricémia, pode ter origem numa redução da síntese de purinas ou num defeito da reabsorção tubular renal.²

Análise sumária de urina

No setor de bioquímica clínica é realizada a análise sumária de urina ou urina tipo II, a fim de completar a avaliação da função renal. A análise sumária de urina inclui a avaliação físico-química da urina e a observação do sedimento urinário. Esta é uma análise complementar para o diagnóstico e monitorização de várias patologias de diferentes etiologias.

Na análise da maioria dos parâmetros pode ser utilizada uma amostra de urina aleatória, no entanto, é recomendada a colheita do jato intermédio da primeira urina da manhã. A quantificação de alguns metabolitos (por exemplo: cistina, oxalatos, ácido cítrico, proteínas, entre outros) requer uma amostra de urina de 24h.¹⁰

i. Avaliação físico-química

A avaliação das características físicas da urina inclui a medição da densidade e a análise visual que permite avaliar a cor e o aspeto. A análise química é feita através da interpretação de uma tira química que permite avaliar os seguintes parâmetros: pH, proteína, glucose, corpos cetónicos, bilirrubina, urobilinogénio, nitritos, sangue e leucócitos. As características físico-químicas da urina e a respetiva interpretação clínica estão resumidas na Tabela I.

Tabela I: Parâmetros da análise sumária da urina e respetivos significados clínicos.

Parâmetros	Significado Clínico
Cor	A coloração da urina é normalmente amarelo-claro. As alterações da cor podem ser devido à dieta, ou devido à presença de certas substâncias na urina.
Aspeto/Turvação	A urina é tipicamente límpida, qualquer turvação pode ser indicativa de patologia.
Densidade	A densidade mede a concentração das partículas na urina, avaliando a capacidade de concentração do rim. No caso de insuficiência renal, pode estar diminuída.
pH	O nível de pH indica a quantidade de ácido na urina, indicando a capacidade do rim de manter o equilíbrio ácido-base.
Proteína	A tira química deteta essencialmente a presença de albumina. Contudo, quando há proteinúria, é necessário fazer o doseamento das proteínas no equipamento Alinity c. (A presença de proteína na urina é abordada mais detalhadamente de seguida).
Glucose	A glicosúria ocorre quando há hiperglicémia ou quando existe falha na reabsorção tubular.
Corpos cetónicos	Os corpos cetónicos podem surgir na urina numa situação de cetoacidose metabólica, frequente em Diabetes.
Bilirrubina	A bilirrubina na urina pode indicar lesão hepatocelular, obstrução biliar ou distúrbio hemolítico.
Urobilinogénio	O urobilinogénio é o produto da degradação da bilirrubina, que pode indicar patologia hepática ou distúrbio hemolítico.
Nitritos	A presença de nitritos sugere uma situação de infeção bacteriana (algumas bactérias reduzem nitratos a nitritos).
Sangue	A presença de hematúria pode ser originada pelas seguintes condições: infeção do trato urinário, cálculos renais, neoplasias ou fármacos.
Leucócitos	A presença de leucócitos na urina sugere ocorrência de infeção do trato urinário.

ii. Sedimento urinário

O sedimento urinário é obtido através da centrifugação da urina, e é observado ao microscópio. Esta avaliação consiste na identificação dos elementos presentes na amostra, nomeadamente leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, células com grânulos, muco, microrganismos (leveduras, bactérias e hifas), cilindros hialinos e granulosos, e cristais, que de acordo com a sua morfologia é possível supor a sua composição (exemplo: urato, ácido úrico, fosfato, oxalato de cálcio, entre outros). Na Tabela II estão representados os elementos que podem ser encontrados no sedimento urinário e o seu significado clínico.

Tabela II: Elementos observados no sedimento urinário e respetivo significado clínico.

Elementos	Significado Clínico
Leucócitos	A presença de leucócitos é indicativa de inflamação ou infeção renal ou do trato urinário (pielonefrite).
Eritrócitos	A hematúria pode ser devido a patologia glomerular (glomerulonefrite), desordem hematológica ou outra condição médica.
Células epiteliais	Células de descamação da vagina ou uretra; Células do trato urinário superior podem ser indicativas de lesão do trato urinário.
Cilindros	Cilindros granulosos são sugestivos de lesão renal ou patologia tubular (necrose tubular aguda); Cilindros hialinos podem ser indicativos de proteína de Tamm-Horsfall ^a .
Cristais	Os cristais são compostos por produtos químicos da urina e podem ser indicativos de cálculos renais.
Microrganismos	As bactérias e leveduras observadas podem ser sugestivas de infeção do trato urinário ou devido a uma má colheita, pois são microrganismo associados à microbiota normal.

No Serviço de Patologia Clínica, a amostra de urina ainda pode ser utilizada para realizar os seguintes testes: teste *screening* de drogas, teste de gravidez e pesquisa *Diquat/Paraquat* (fertilizantes usados para suicídio/intoxicação por organofosforados).

Proteinúria

A proteinúria consiste no aumento da excreção de proteínas pelo rim, desta forma, esta determinação tem valor de diagnóstico e prognóstico da doença renal, além de permitir avaliar a eficácia da terapêutica e evolução da patologia.

Em condições normais, o rim tem a capacidade de reter as proteínas na corrente sanguínea através da barreira de filtração glomerular, uma vez que esta apenas apresenta permeabilidade para proteínas de baixa massa molecular, sendo estas reabsorvidas nos túbulos proximais e

^a Proteína Tamm-Horsfall: glicoproteínas secretadas por células tubulares.²

assim retomam à corrente sanguínea. Desta forma, numa situação normal a quantidade de proteína na urina é muito reduzida.^{2:11}

A presença de proteínas na urina pode ter várias causas, nomeadamente excesso de proteinémia (exemplo: proteína de Bence Jones^b), lesão glomerular, lesão tubular, proteinúria pós-renal provocada por danos ou inflamação do trato urinário inferior.^{2:11}

A proteinúria glomerular pode ser originada por várias condições, como nefropatia diabética, glomerulonefrite, nefrotoxicidade de origem medicamentosa, entre outras. As glomerulonefrites são caracterizadas pela disfunção do glomérulo, podendo levar à perda da capacidade de filtração das proteínas devido à alteração da barreira de filtração, como ocorre na síndrome nefrótica. Nesta situação, a albumina é a primeira proteína a ser eliminada na urina, pois possui uma massa molecular próxima do limiar de filtração. No início da lesão glomerular, o aumento da excreção de albumina é pouco expressivo, por esse motivo são utilizados imunoensaios para aumentar a sensibilidade de deteção da albumina. A presença de baixas concentrações de albumina na urina denomina-se de microalbuminúria. Esta análise proporciona um diagnóstico precoce da lesão glomerular.^{2:11}

A proteinúria tubular é caracterizada pela presença de proteínas de baixo peso molecular na urina, devido à diminuição da reabsorção tubular. Desta forma, as proteínas filtradas não retomam à corrente sanguínea e são eliminadas na urina.^{2:11}

O método de referência para a determinação da proteinúria preconiza o uso da amostra de urina colhida em 24h, visto que há variação da excreção de proteínas ao longo do dia. Devido aos inconvenientes da colheita de urina durante esse período de tempo, sugere-se o uso de amostras aleatórias de urina para a determinação de proteínas, desde que a quantidade destas seja expressa em relação à quantidade de creatinina excretada, e assim anula a variação resultante da diluição da urina.¹¹

Análise química do cálculo renal

No laboratório do HUC é feita a análise química de cálculos renais através de métodos colorimétricos. A finalidade desta análise consiste na determinação semi-quantitativa dos constituintes do cálculo. Estes podem ser cálcio, oxalato, fosfato, magnésio, ácido úrico e cistina. A percentagem de cada constituinte é estabelecida consoante a comparação visual entre a escala de cores disponível no *kit* e a solução obtida.

^b Proteína de Bence Jones está associada ao Mieloma Múltiplo.⁶⁵

7.1.2. Avaliação do equilíbrio hidro-eletrolítico

O equilíbrio hidro-eletrolítico é mantido através da regulação das concentrações da água e dos eletrólitos entre o espaço extracelular e intracelular. O espaço extracelular é composto pelo fluido intersticial e plasma, e os iões mais abundantes deste espaço são o sódio, o cloreto e o bicarbonato, além destes o cálcio e o magnésio, que estão ligados a proteínas. No compartimento intracelular, os eletrólitos mais abundantes são o potássio, magnésio e fosfato.^{2;12} A diferença de constituição entre o espaço intersticial e o interior da célula é o que permite manter a neutralidade elétrica das células e gerar potencial de ação para ocorrer contração muscular e transmissão do impulso nervoso. Os desequilíbrios hidro-eletrolíticos podem originar distúrbios funcionais em todo o organismo, e conseqüentemente levar a complicações potencialmente fatais. Desta forma, a avaliação hidro-eletrolítica é importante para avaliar a homeostase do organismo. No laboratório, esta avaliação é feita através da determinação da osmolalidade, e essencialmente pelo doseamento das concentrações sanguíneas do Na^+ , K^+ e Cl^- , também denominado de ionograma. Além disso, também podem ser doseados outros iões como HCO_3^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , entre outros.^{2;13}

Ionograma

i. Sódio

O sódio é o catião que existe em maior quantidade no espaço extracelular, sendo o ião responsável pela pressão osmótica e manutenção do volume do fluido extracelular. No espaço intracelular, o Na^+ apresenta uma baixa concentração devido à ação da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ e pelo facto da membrana celular não ser permeável ao sódio.^{2;12} O Na^+ é obtido principalmente através da absorção gastrointestinal, e pode ser eliminado pela via renal. Os rins são responsáveis pela regulação de Na^+ , e por sua vez, pela regulação de água no fluido extracelular. A ativação sistema renina-angiotensina-aldosterona promove a reabsorção de sódio no túbulo distal.^{2;13}

Um distúrbio da homeostase da água está intrinsecamente relacionado com a alteração da homeostase do Na^+ . A hiponatremia consiste na diminuição da concentração sérica do Na^+ , que pode resultar da perda de Na^+ ou do excesso de água. Esta condição clínica ocorre em situações de vômitos persistentes, uso de diuréticos, queimaduras, perda gastrointestinal, nefropatia tubular, hipotiroidismo, polidipsia, SIADH^c, entre outros.² A pseudo-hiponatremia é uma falsa diminuição do valor de sódio. Esta situação pode surgir devido ao aumento anormal de macromoléculas, como os lípidos e as proteínas. Desta forma, a fração de macromoléculas

^c SIADH: Síndrome de secreção inapropriada da hormona ADH

do plasma aumenta de volume, e conseqüentemente a fração aquosa diminui de volume. Assim sendo, como o sódio está contido na solução aquosa, o seu doseamento será incorretamente baixo.^{14;15}

O aumento da concentração plasmática de sódio denomina-se de hipernatrémia, esta condição deve-se à perda de água ou ao ganho excessivo de Na^+ . A hipernatrémia é comum em situações de desidratação, diabetes insípida, hiperaldosterismo, ou outras causas.^{2;12;16}

ii. Potássio

O potássio é o principal catião intracelular, a concentração elevada dentro da célula é mantida pela bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$, que promove o movimento do K^+ para o interior da célula contrariando o gradiente de concentração. O K^+ é fundamental na manutenção do potencial de membrana que está envolvido nos processos de excitação e contração celular. Tal como acontece com o Na^+ , a concentração de K^+ também é regulada pelo rim. Neste caso, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona promove a secreção de K^+ no túbulo distal.^{2;13;16}

O desequilíbrio da homeostase do K^+ está associado a graves conseqüências, como arritmias cardíacas e espasmos musculares. A hipocaliémia pode ter origem na perda de fluídos com elevado teor de potássio. Estas situações são associadas a causas como a perda gastrointestinal ou renal, aumento da diurese, hiperaldosterismo ou uma situação de alcalose. Por outro lado, a hiperkaliémia pode ser devido ao aumento da ingestão ou da retenção de K^+ . Isto pode ocorrer em situações de lesão celular, nefropatia, desidratação, hipoaldosteronismo ou acidose metabólica. A pseudo-hiperkaliémia consiste num falso aumento da concentração K^+ , que pode resultar de fatores pré-analíticos, nomeadamente hemólise, trombocitose ou leucocitose.^{2;16}

iii. Cloreto

O cloreto é o principal anião do espaço extracelular, participando na manutenção da pressão osmótica e no equilíbrio eletrolítico e ácido-base.² A concentração plasmática de Cl^- também é regulada pelo rim, este é responsável pela excreção do excedente de Cl^- .¹⁷

As causas de hipoclorémia são semelhantes às causas de hiponatrémia, como quando há perda de cloreto em situações de vômitos, uso de diuréticos, ou aumento da quantidade de água, nomeadamente em situações de SIADH. Contudo, em situações de alcalose metabólica ou acidose respiratória compensada, há uma hipoclorémia sem existir diminuição da concentração sérica de sódio, isto ocorre devido à retenção de bicarbonato, e conseqüentemente aumento de Cl^- .

A hiperclorémia ocorre em situações semelhantes às que dão origem à hipernatrémia, nomeadamente desidratação, queimaduras, ou aumento da reabsorção renal de Cl^- . Contudo,

no caso de acidose metabólica ou alcalose respiratória, há aumento da concentração de Cl^- devido à compensação renal pela excreção de bicarbonato.^{16;15;18}

Bicarbonato

O HCO_3^- é um anião essencial para a homeostase ácido-base, pois desempenha um papel importante como sistema tampão da corrente sanguínea. O rim contribui para a regeneração e reabsorção de HCO_3^- , permitindo a regulação da concentração plasmática desta substância.¹⁶ O desequilíbrio ácido-base pode resultar numa condição patológica de acidose ou alcalose. A acidose metabólica consiste na acumulação de ácido no organismo, que resulta na diminuição do pH. Desta forma, há consumo do sistema tampão que é constituído por HCO_3^- , e por isso vai haver diminuição da sua concentração sanguínea. Por outro lado, a alcalose metabólica consiste na acumulação de bases, e assim, o pH está aumentado e há excesso de HCO_3^- .²

Osmolalidade

O conceito de osmolalidade é definido como a concentração total de partículas por unidade de volume de água, ou seja, reflete o equilíbrio de todos os solutos entre o compartimento extracelular e intracelular. As substâncias que contribuem mais para a osmolalidade plasmática são Na^+ , Cl^- , glicose e ureia.^{2;12;16} A osmolalidade do soro é calculada através de fórmulas, como a que está citada em baixo.¹⁹

$$\text{Osm (mOsm/kg H}_2\text{O)} = (2 \times [\text{Na}^+]) + (1,4 \times [\text{glucose}]) + (1,2 \times [\text{ureia}])$$

A osmolalidade da urina e de outros líquidos biológicos é determinada no osmómetro, por crioscopia através do ponto de congelação.

7.1.3. Avaliação da função hepato-biliar

O fígado tem um papel fundamental na homeostase de todo o organismo, visto que participa na digestão dos alimentos, na síntese de substâncias essenciais para o organismo e na biotransformação de moléculas tóxicas, permitindo assim a eliminação das mesmas. Além disso, o fígado também está envolvido na função endócrina, através da síntese e catabolismo de hormonas.²

A unidade funcional do fígado é o lóbulo hepático que é constituído por 6 ácinos. Cada ácino contém a tríade porta formada pela veia porta, artéria hepática e ducto biliar. Este sistema ramifica-se, permitindo o contacto da unidade funcional com a unidade metabólica, o hepatócito.

As substâncias absorvidas a nível intestinal são metabolizadas pelos hepatócitos. Estas células são responsáveis pela realização da maior parte da função metabólica, excretora e

síntese hepática. Os hepatócitos produzem os sais biliares e a bÍlis, que são substâncias importantes para a digestão e absorção dos lípidos ingeridos na dieta.^{2;20}

A avaliação hepática inclui o estudo da função e lesão hepática através de testes laboratoriais que permitem avaliar precocemente a alteração da função e a ocorrência de lesão hepatocelular. A determinação das enzimas hepáticas permite avaliar ambas as situações referidas anteriormente. As principais enzimas hepáticas são compostas pela alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP). A alteração da atividade enzimática indica a presença de patologias do fígado ou obstrução no fluxo biliar.² A determinação sérica destas enzimas permite fazer a distinção entre estas duas causas. O aumento dos níveis de ALT e AST no soro pode ser indicativo de lesão hepatocelular. No entanto, o aumento sérico dos níveis da GGT e ALP sugerem a ocorrência de colestase.²⁰

A função de síntese hepática é responsável pela produção de moléculas necessárias para o organismo. O fígado regula o metabolismo dos hidratos de carbono através da produção de glicose em situações de jejum. Do mesmo modo, este órgão também controla o metabolismo lipídico, estando envolvido na síntese e digestão de lípidos. Além disso, é responsável pela síntese de proteínas plasmáticas e fatores de coagulação. A avaliação da função de síntese é realizada através da determinação sérica da glucose, proteínas, albumina e determinação do tempo de protrombina.²

A função excretora é caracterizada pela biotransformação da bilirrubina. A avaliação desta função hepática é feita através da determinação da bilirrubina e ácidos biliares, tanto no soro como na urina.²

A regulação metabólica desempenhada pelo fígado é avaliada através da determinação sérica da amónia e ureia, resultantes do catabolismo de proteínas.²

De seguida, são apresentados os biomarcadores usualmente utilizados na avaliação hepática e uma breve explicação acerca de cada um deles.

Aminotransferases

As aminotransferases ou transaminases são enzimas produzidas de forma predominante nos hepatócitos. Estas enzimas catalisam uma reação reversível que consiste na transferência do grupo amina de um aminoácido para o α -cetoglutarato, dando origem ao cetoácido correspondente ao aminoácido inicial e ao glutamato.^{2;20}

As isoenzimas mais relevantes na prática clínica são a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT). A especificidade de cada enzima deve-se ao aminoácido dador do grupo amina, aspartato no caso da AST e alanina no caso da ALT.² A determinação

sérica das aminotransferases é útil para o diagnóstico de doenças hepáticas, pois na ocorrência de lesão hepática, estas enzimas são libertadas para a corrente sanguínea e há um aumento da sua concentração. No entanto, deve ser considerado o contexto clínico do paciente, pois os níveis séricos destas enzimas variam consoante muitos fatores como o sexo, a idade e administração de determinados fármacos.²⁰

i. Aspartato aminotransferase (AST)

A AST é uma enzima localizada no citoplasma e na mitocôndria, e está amplamente distribuída por todo o organismo. Está presente numa grande variedade de tecidos nomeadamente o coração, fígado, músculo esquelético e rim. Por essa razão, não é um biomarcador hepático muito específico e o seu aumento na corrente sanguínea pode indicar lesão hepatocelular, muscular ou outra condição fisiológica.^{21;22}

ii. Alanina aminotransferase (ALT)

A ALT é uma enzima exclusivamente citoplasmática e está presente em elevadas concentrações nos hepatócitos, e em menor quantidade no rim, coração e músculo esquelético. Assim sendo, a ALT é a enzima hepática mais específica, e por isso é considerada um excelente biomarcador da lesão hepatocelular.^{2;20}

Gama-Glutamiltransferase (GGT)

A GGT catalisa a degradação de peptídeos e transporta aminoácidos e peptídeos através da membrana celular. Esta enzima está presente no túbulo renal, fígado, pâncreas e trato biliar. Um valor elevado da concentração sérica da GGT é sugestivo de uma obstrução do fluxo biliar, um distúrbio tubular renal ou outras causas, como a ingestão contínua de álcool. Apesar da GGT ser um biomarcador sensível não tem especificidade, então o seu uso isolado é limitado para o diagnóstico da doença hepatobiliar. Assim sendo, é importante o doseamento simultâneo da GGT e da ALP, pois ambas encontram-se elevadas em patologias como, colestase, cirrose biliar primária, neoplasia das vias biliares, entre outras.^{2;23}

Fosfatase Alcalina (ALP)

A enzima ALP tem uma distribuição ampla no organismo, mais particularmente, no fígado, ductos biliares, tecido ósseo, intestino, rim e placenta.^{2;23}

O aumento sérico da concentração da ALP é essencialmente indicativo de patologia hepática devido a colestase, ou doenças ósseas devido ao aumento da atividade dos osteoblastos. Este biomarcador também tem baixa especificidade, e por essa razão a sua determinação deve ser feita em conjunto com a GGT para comprovar a origem do seu

aumento, como dito anteriormente. O aumento da concentração de ALP na corrente sanguínea também se verifica de forma fisiológica ao longo da adolescência e gravidez.^{2;10}

Bilirrubina

A bilirrubina consiste num pigmento derivado da degradação do grupo heme das hemeproteínas (hemoglobina, mioglobina e outras). A produção de bilirrubina inicia-se na transformação do grupo heme em bilirrubina não conjugada, uma substância lipossolúvel que necessita de estar ligada à albumina para circular na corrente sanguínea.²² O fígado capta a bilirrubina não conjugada, e a biotransformação desta molécula decorre nos hepatócitos. A biotransformação consiste na conjugação da molécula de bilirrubina com o ácido glucorónico, formando a bilirrubina conjugada. Este produto apresenta uma elevada polaridade e é solúvel em água, como tal, não necessita de transportador para circular no sangue, e assim pode ser facilmente eliminada do organismo.²⁰ A bilirrubina conjugada é secretada através dos canalículos biliares para ser armazenada na vesícula biliar ou é excretada diretamente para o intestino. No intestino a bilirrubina é convertida em urobilinogénio por ação das enzimas bacterianas da microbiota intestinal. Cerca de 30% desse urobilinogénio é reabsorvido na mucosa intestinal e entra no circuito entero-hepático, no qual 20% é novamente excretado para o intestino através dos canalículos biliares e 10% do urobilinogénio entra na circulação sanguínea e é eliminado através do rim na forma de urobilina devido à presença de oxigénio.^{24;25}

Na Figura 2 está demonstrado o metabolismo da bilirrubina.

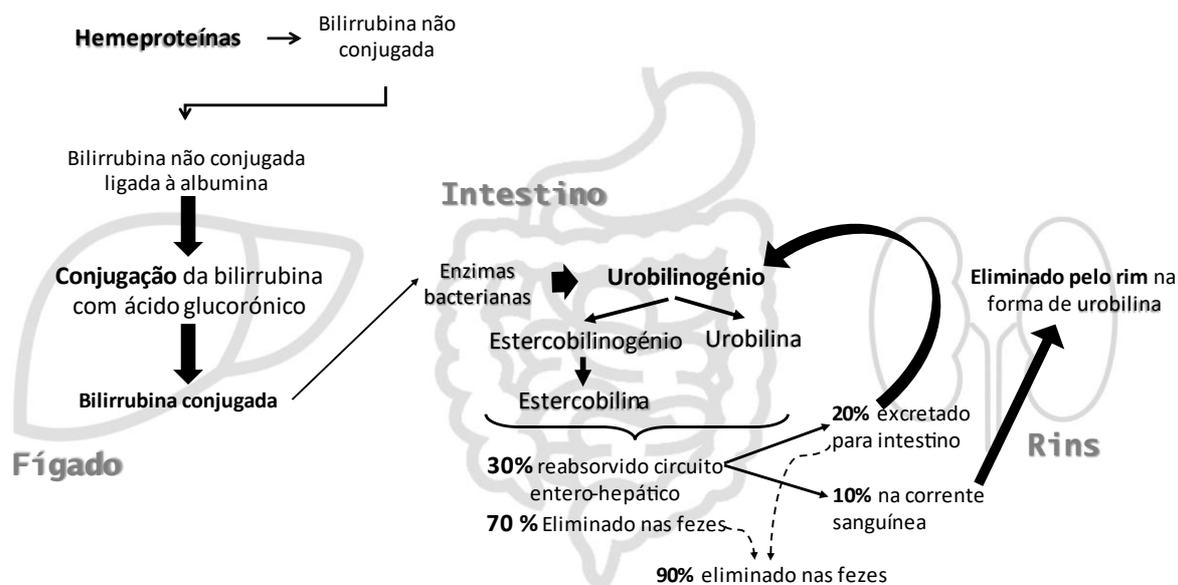


Figura 2: Representação esquemática do metabolismo da bilirrubina.

A bilirrubina direta é a fração de bilirrubina que foi conjugada com o ácido glucorónico e é solúvel em água. Enquanto que, a bilirrubina indireta é a bilirrubina não conjugada com o ácido glucorónico.²

O excesso da concentração de bilirrubina na corrente sanguínea denomina-se de hiperbilirrubinémia, e esta pode originar icterícia. Esta condição é caracterizada pela deposição de pigmentos biliares na pele, adquirindo uma cor amarela-esverdeada. O aumento de bilirrubina na corrente sanguínea pode ser devido ao excesso de bilirrubina não conjugada, de bilirrubina conjugada, ou de ambas.² Na Tabela III estão indicadas as causas da hiperbilirrubinémia conjugada e não conjugada.

Tabela III: Causas de hiperbilirrubinémia não conjugada e hiperbilirrubinémia conjugada.

Hiperbilirrubinémia não conjugada	Hiperbilirrubinémia conjugada
Aumento da produção da bilirrubina	Colestase intra-hepática
<ul style="list-style-type: none"> Anemia hemolítica 	<ul style="list-style-type: none"> Cirrose biliar primária^d Hepatite alcoólica e não alcoólica Fármacos Gravidez Condições hereditárias
Falha na captação da bilirrubina no fígado	Lesão hepatocelular
<ul style="list-style-type: none"> Falência hepática Fármacos 	<ul style="list-style-type: none"> Hepatite viral, alcoólica e não alcoólica Doença hepática autoimune Neoplasias (carcinoma hepatocelular) Fármacos Condições metabólicas hereditárias
Falha na conjugação da bilirrubina	Colestase extra-hepática
<ul style="list-style-type: none"> Patologias genéticas: Síndrome de Gilbert^e; Síndrome Crigler-Najjar^f Fármacos Cirrose avançada 	<ul style="list-style-type: none"> Coledocolitíase (cálculo biliar) Neoplasias (cancro pancreático) Pancreatite aguda ou crónica Colangite esclerosante primária^g

Na prática clínica é feito o doseamento da bilirrubina total, que consiste na soma das duas frações descritas anteriormente. Caso se verifique um aumento na bilirrubina total, é feito o doseamento da bilirrubina direta. A bilirrubina indireta é obtida pela diferença entre as bilirrubinas total e direta. Estas determinações analíticas permitem fazer um diagnóstico diferencial do tipo de hiperbilirrubinémia.

^d Cirrose biliar primária é uma doença hepática resultante da destruição dos ductos biliares no interior do fígado.²

^e Síndrome de Gilbert é uma condição hereditária que consiste na deficiência da enzima gluconiltransferase hepática.²

^f Síndrome Crigler-Najjar é uma doença caracterizada pela ausência ou deficiência da UDP-glucuronil.²

^g Colangite esclerosante primária consiste numa inflamação dos ductos biliares extra-hepáticos, tornando-os rígidos e estreitos.²

A hiperbilirrubinemia pré-hepática é originada pelo excesso de bilirrubina não conjugada na corrente sanguínea. A causa mais comum desta hiperbilirrubinemia é a ocorrência de hemólise que provoca o aumento da degradação da hemoglobina. Desta forma, a produção de bilirrubina excede a capacidade de excreção hepática e há um aumento de bilirrubina não conjugada.^{20,25} O diagnóstico desta hiperbilirrubinemia deve ser complementado com a visualização de um esfregaço sanguíneo, teste de Coombs e determinação sérica da hemoglobina e haptoglobina para comprovar a ocorrência de hemólise.^{20,24} Neste caso, como não há lesão hepática, os restantes testes da função hepática não estão alterados.²⁵

A hiperbilirrubinemia hepática está relacionada diretamente com o funcionamento hepático e pode ocorrer o aumento da concentração da bilirrubina conjugada, não conjugada ou ambas.²⁵ Se houver excesso de bilirrubina não conjugada, a causa deve-se à incapacidade de captação ou conjugação da bilirrubina por parte dos hepatócitos. Neste caso, como a bilirrubina não consegue ser conjugada, não há presença de bilirrubina ou urobilinogénio nas fezes e na urina.²⁵ Por outro lado, o aumento da bilirrubina conjugada pressupõe que o fígado tem capacidade de conjugação, então a falha ocorre na secreção pelos canalículos biliares. Esta situação é causada pela lesão hepatocelular, e então é caracterizada pela alteração de outros parâmetros bioquímicos como o aumento da ALT e AST.²⁰

A bilirrubina vai acumular-se no sangue e como tem elevada solubilidade pode ser excretada na urina, que irá apresentar uma coloração escura. Neste caso, vai ocorrer uma diminuição do urobilinogénio por consequência da redução da bilirrubina no intestino. Esta situação também pode ocorrer na presença de uma colestase intra-hepática, mas nesta situação há o aumento da GGT, ALP, ALT e AST.

A hiperbilirrubinemia pós-hepática ocorre quando há uma obstrução no fluxo biliar. A colestase impede a passagem da bÍlis e esta não alcança o intestino. Desta forma, a permanência da bilirrubina nos canalículos biliares vai provocar destruição celular, e assim há um aumento da concentração sérica da GGT e ALP. A bilirrubina conjugada passa para a corrente sanguínea e assim é eliminada na urina, que vai apresentar uma coloração muito escura devido à presença de bilirrubina. Além disso, a urina não vai conter urobilinogénio, pois este não irá ser produzido no intestino. As fezes vão ter uma aparência descolorada, pois também não contêm urobilinogénio.^{24,25}

Proteínas totais

A determinação de proteínas totais inclui todas as proteínas plasmáticas circulantes, em que a maioria são sintetizadas no fígado. As proteínas são essenciais na manutenção da pressão oncótica e na sua função de sistema tampão no espaço intravascular.²

A concentração plasmática resulta do *turnover* proteico, tendo em conta a síntese e a degradação das proteínas. O doseamento é útil para o diagnóstico e avaliação de distúrbios metabólicos, estados de hidratação, estados nutricionais, patologias hepáticas, patologias renais, entre outras. Qualquer alteração na proteinémia sugere uma análise adicional por eletroforese de proteínas.²

A causa mais comum de hiperproteinémia é a desidratação devido à hipovolémia. No entanto, numa situação de hiperproteinémia, é realizada uma eletroforese de proteínas para esclarecer o motivo dessa alteração. O proteinograma representado na Figura 1, apresenta uma situação normal do perfil de proteínas.

Por outro lado, a hipoproteinémia pode ser causada por hepatopatias, neoplasias, queimaduras, hemorragias, síndrome nefrótica, entre outras. Hipoproteinémia acentuada também se verifica em situação de lesão hepática crónica. Contudo, numa lesão hepática aguda, a redução das proteínas é pouco expressiva.²

Albumina

A albumina é sintetizada exclusivamente no fígado, e como tal permite avaliar a função de síntese hepática.²² Esta proteína é a principal proteína plasmática, responsável pela manutenção da pressão oncótica e pelo transporte de moléculas na corrente sanguínea.^{2,26}

A hipoalbuminémia, diminuição da concentração plasmática da albumina, pode ocorrer como resultado da diminuição da síntese associada à doença hepática ou pelo aumento da perda renal ou gastrointestinal, associada à síndrome nefrótica e enteropatias, respetivamente. Outras causas da diminuição plasmática da albumina incluem a desnutrição, queimaduras e o processo inflamatório, pois a albumina é uma proteína de fase aguda negativa. A diminuição da albuminémia pode originar complicações clínicas como edema, hiperbilirrubinémia e hiperlipidémia. Por outro lado, a hiperalbuminémia, o aumento da concentração plasmática da albumina, está geralmente associada a situações de desidratação grave.^{2,26}

A determinação sérica da albumina é considerada um teste de função da síntese hepática. O tempo de semi-vida da albumina é cerca de 20 dias, portanto, esta proteína tem um *turnover* lento. Deste modo, é considerado um bom indicador de cronicidade para doenças hepáticas, visto que a diminuição da albuminémia é mais acentuada em situações crónicas do que em situações de patologia hepática aguda.

A interpretação do doseamento da albumina deve ser feita tendo em consideração outras determinações, como é o caso da avaliação do tempo de protrombina, que permite avaliar a atividade das proteínas de coagulação sintetizadas no fígado, nomeadamente os fatores I, II, V,

VII e X. Desta forma, o tempo de protrombina também permite avaliar a capacidade de síntese hepática.^{20;22}

A associação entre a albumina e o tempo de protrombina permite excluir as alterações destes parâmetros de origem extra-hepática. A albumina pode estar diminuída devido à síndrome nefrótica, má absorção e desnutrição, e o tempo de protrombina pode estar aumentado pela deficiência de vitamina K.

Se o tempo de protrombina for prolongado por doença hepatocelular, também se verifica a diminuição da concentração plasmática da albumina.^{2;20;22}

7.1.4. Avaliação do perfil lipídico

Os lípidos são moléculas hidrofóbicas e solúveis em solventes orgânicos. Estes compostos são essenciais no organismo porque realizam funções endócrinas, energéticas, estruturais e ainda participam na digestão.^{2;27}

Os lípidos circulam no plasma incorporados em lipoproteínas, ou de forma livre ligados à albumina, como os ácidos gordos. As lipoproteínas são constituídas por triglicéridos, colesterol, fosfolípidos e apolipoproteínas. As lipoproteínas plasmáticas incluem os quilomicron, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermédia (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Estas apresentam diferentes proporções no seu conteúdo proteico e lipídico, e isso permite classificá-las de acordo com as diferentes densidades (Anexo III, Tabela VII).^{2;27}

A determinação laboratorial do perfil lipídico contribui para o diagnóstico e tratamento de patologias relacionadas com o metabolismo das lipoproteínas. Além disso, permite avaliar o risco de aterosclerose. Esta patologia consiste num estado inflamatório crónico provocado pela formação de placas ateroscleróticas na parede interna das artérias de maior calibre. O processo aterosclerótico está associado a um maior risco de desenvolver doença cardiovascular (DCV), uma das maiores causas de morte em todo o mundo.²⁸ Os fatores de risco contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, estes incluem a obesidade, hipertensão, diabetes, histórico familiar, idade, sexo, níveis elevados de colesterol LDL, níveis diminuídos de colesterol HDL e um estilo de vida pouco saudável (dieta rica em gorduras, vida sedentária, tabaco e stress).^{27;28}

Os parâmetros analíticos determinados para estimar o risco de desenvolver doença aterosclerótica são: colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicéridos (TG).²⁹

Colesterol total

O colesterol advém essencialmente da síntese hepática, e uma pequena porção deriva da dieta. Esta molécula exerce funções biológicas essenciais para todas as células do organismo,

pois é um constituinte da membrana celular e de lipoproteínas, além de ser um precursor da síntese de hormonas esteróides e ácidos biliares.²

A homeostase celular do colesterol é assegurada pelo influxo e efluxo do colesterol, funções desempenhadas pelas lipoproteínas LDL e HDL, respetivamente. O aumento do colesterol intracelular é tóxico para a célula, por isso são desencadeados vários mecanismos a fim de colmatar esse excesso. Desta forma, ocorre a inibição da síntese de colesterol e da expressão de recetores LDL na superfície celular, o que vai impedir a captação das LDL da corrente sanguínea. Além disso, o excesso de colesterol pode ainda ser armazenado no interior da célula ou removido da célula através do transporte reverso do colesterol realizado pelas HDL.²

Na prática clínica, a determinação do colesterol total permite ter uma visão geral do metabolismo das lipoproteínas, neste sentido, contribui para o diagnóstico de dislipidémias e avalia o risco de desenvolvimento de aterosclerose e DCV.

Colesterol HDL

A lipoproteína de elevada densidade (HDL) é composta por cerca de 50% de proteína, principalmente pela apolipoproteína A₁ (ApoA₁). Esta lipoproteína é responsável pelo transporte reverso do colesterol, que consiste no efluxo do excesso de colesterol das células periféricas para as células hepáticas, onde decorre a excreção de colesterol. Além disso, a HDL também é anti-aterogénica e impede a formação de placas ateroscleróticas devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-trombóticas e anti-apoptóticas. Desta forma, considera-se que as HDL têm um papel protetor cardiovascular, e por isso, a determinação laboratorial destas partículas é fundamental para estimar o risco aterosclerótico. Como as HDL são marcadores negativos de risco cardiovascular, o aumento da concentração plasmática de HDL está associado a uma redução do risco de DCV. A concentração de HDL é determinada através do doseamento de colesterol HDL ou do doseamento de ApoA₁.^{2:28;30}

Colesterol LDL

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é constituída essencialmente por colesterol e pela apolipoproteína B₁₀₀ (ApoB₁₀₀). Esta partícula é o principal transportador do colesterol do fígado para células periféricas. A concentração plasmática da molécula de LDL depende dos níveis plasmáticos de VLDL e da quantidade de recetores de LDL no fígado. O aumento da quantidade plasmática de TG e alguns fatores metabólicos contribuem para o aumento das VLDL no plasma, que por sua vez levam ao aumento plasmático das LDL pela ação da lipoproteína lípase.³¹ A expressão de recetores LDL nos hepatócitos é modulada pela necessidade de colesterol da célula. Assim sendo, quanto maior for a concentração de

colesterol intracelular, menos colesterol é necessário na célula, e então, menos recetores LDL são expressos à superfície celular. Desta forma, há menos captação das moléculas LDL da corrente sanguínea e assim os níveis plasmáticos de colesterol LDL aumentam.²

O aumento dos níveis de colesterol LDL no plasma, denomina-se de hipercolesterolemia LDL. Esta condição tem um elevado impacto no desenvolvimento de aterosclerose. A LDL é a principal responsável pelo desenvolvimento desta doença devido ao facto de ser a mais abundante no plasma e a mais aterogénica. As suas características aterogénicas incluem a capacidade de entrar na parede da artéria, devido ao seu tamanho reduzido e à alteração da ApoB₁₀₀, que leva à oxidação da lipoproteína como consequência do aumento de tempo de permanência no plasma.^{27;31}

A avaliação do colesterol LDL é feita pela determinação directa de colesterol LDL ou a quantificação da ApoB. Esta análise laboratorial permite estimar o risco de DCV e monitorizar o tratamento com hipolipemiantes.

Triglicéridos

Os triglicéridos (TG) são compostos por três moléculas de ácidos gordos e uma molécula de glicerol. Estes são uma fonte de energia nas células periféricas, e podem ser obtidos através da dieta ou sintetizados endogenamente pelo fígado. A elevada concentração de TG e lipoproteínas ricas em TG está intimamente relacionada com o aumento do risco de DCV, devido ao facto dessas lipoproteínas darem origem à lipoproteína LDL. Desta forma, a avaliação de TG também deve ser considerada para estimar o risco de DCV.^{2;28}

7.1.5. Avaliação da função cardíaca

As patologias cardíacas mais comuns são a insuficiência cardíaca e a doença isquémica aguda. Esta última pode ser consequência da aterosclerose, e pode ter complicações graves como o enfarte agudo do miocárdio (EAM). A ocorrência do EAM pode ser provocada por uma obstrução das artérias coronárias, o que leva à diminuição da oxigenação do músculo cardíaco, resultando na lesão ou morte do miocárdio. Este evento causa a libertação de enzimas e proteínas estruturais cardíacas, que podem ser utilizadas como biomarcadores da lesão do miocárdio. A determinação de biomarcadores cardíacos na corrente sanguínea permite fazer o diagnóstico da doença cardíaca, dado que a avaliação simultânea de todos estes parâmetros dá uma visão geral da função cardíaca, e nem sempre é possível detetar anomalias no eletrocardiograma. Desta forma, o laboratório tem um papel fundamental no doseamento da mioglobina, isoforma MB da creatina cinase (CK-MB), peptídeos natriuréticos, troponinas cardíacas (cTns), mais especificamente a troponina I cardíaca (cTnI) e a troponina T cardíaca (cTnT), e proteína C reativa de alta sensibilidade (*hs*-PCR).^{2;32;33}

Mioglobina

A mioglobina é uma hemoproteína responsável pela ligação do oxigênio nas células musculares. O aumento da mioglobina na corrente sanguínea pode ser devido à lesão do músculo esquelético ou músculo cardíaco, entre outras causas. No entanto, a determinação desta proteína contribui para o diagnóstico de EAM, uma vez que é um marcador com elevada sensibilidade, pois o seu aumento ocorre 1 a 4h após a lesão. Apesar de ser um biomarcador precoce, a sua utilidade é limitada, pois não tem especificidade, e assim não permite distinguir o EAM de outro tipo de lesão muscular. Além disso, a mioglobina tem um período curto de deteção na corrente sanguínea, dado que tem uma baixa massa molecular e é rapidamente eliminada pela via renal.^{2;32}

Creatina cinase

A creatina cinase (CK) é uma enzima que catalisa a fosforilação da creatina nas células do músculo e cérebro. Esta enzima é composta pelas subunidades M e B, e assim resultam 3 isoenzimas, intituladas de creatina cinase do tecido cerebral (CK-BB) ou CK₁, creatina cinase do músculo cardíaco (CK-MB) ou CK₂, e creatina cinase do músculo esquelético (CK-MM) ou CK₃. O músculo cardíaco tem mais quantidade da isoforma CK-MB, apesar desta também estar presente em poucas quantidades no músculo esquelético. Por isso, a CK-MB é a isoforma mais específica do miocárdio. O aumento da CK-MB no sangue deve-se essencialmente ao dano celular do tecido cardíaco. Esse aumento verifica-se 4 a 8h após a ocorrência dos primeiros sintomas e atinge o valor máximo entre as 18 e 24h. A determinação da CK-MB é importante no diagnóstico de EAM em conjunto com a avaliação dos outros biomarcadores cardíacos.^{2;33}

Peptídeos natriuréticos

O peptídeo natriurético tipo B (BNP) é sintetizado e libertado pelos miocárdios dos ventrículos em situações de stress ou tensão na parede dos ventrículos. A síntese é iniciada com a formação do pro-BNP, que posteriormente é clivado originando a porção N-terminal do pro-BNP (NT-proBNP) e o BNP fisiologicamente ativo. Esta substância é responsável pela inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso simpático, promovendo a vasodilatação, a natriurese e a diurese. Variados fatores influenciam a concentração sanguínea do BNP, nomeadamente a idade, o sexo, obesidade, função renal, alterações estruturais e funcionais cardíacas, entre outros.^{2;34;35}

A disfunção cardíaca origina uma sobrecarga do volume de sangue no ventrículo, causando um aumento de pressão na parede ventricular. Como resposta fisiológica a esta situação, os níveis de BNP e NT-proBNP aumentam na corrente sanguínea. Desta forma, a quantidade de

BNP é inversamente proporcional à capacidade funcional dos ventrículos. Considera-se então que o BNP é um biomarcador sensível a alterações do ventrículo, e por isso, a determinação do BNP ou NT-proBNP no sangue é crucial para o diagnóstico de insuficiência cardíaca. Esta patologia é caracterizada pela incapacidade do coração bombear sangue suficiente para todos os tecidos do organismo. Por isso, um diagnóstico célere é fundamental para implementar uma terapêutica eficaz, e assim reduzir a morbidade e a mortalidade associadas a esta doença.^{2,35}

O BNP e o NT-proBNP também podem estar aumentados no sangue após a ocorrência de um evento isquémico. O NT-proBNP pode ser útil para o diagnóstico de EAM e para identificar o local onde ocorreu o EAM.³³ O BNP não é utilizado no diagnóstico de EAM porque não é suficientemente sensível, nem específico. Contudo, são úteis como marcadores de prognóstico após um EAM para posterior orientação terapêutica.³⁴

Na prática clínica, a diferença entre o BNP e o NT-proBNP resume-se ao facto do NT-proBNP apresentar uma maior estabilidade, uma semi-vida mais longa devido a uma eliminação mais lenta, e atingir concentrações sanguíneas mais elevadas. A determinação do BNP e do NT-proBNP é realizada numa amostra de sangue com EDTA. Ambas as substâncias apresentam sensibilidade e especificidade semelhante, e podem ser usadas para o diagnóstico e monitorização de insuficiência cardíaca.^{2,32}

Troponinas cardíacas

As troponinas são proteínas estruturais da fibra muscular que regulam a contração cardíaca. O complexo é constituído por 3 subunidades, intituladas de troponina C, troponina T e troponina I. A cTnI e cTnT, expressas no músculo cardíaco, apresentam ligeiras diferenças face às troponinas encontradas em outros músculos, como tal, estas isoformas são mais específicas do músculo cardíaco. Desta forma, 4 a 8h após a ocorrência da lesão do miocárdio, há a libertação de cTnT e cTnI para o sangue. Estas atingem o seu nível máximo entre as 12 e 24h e permanecem na corrente sanguínea durante 1 semana.^{2,33}

As cTns são consideradas marcadores ideais para o diagnóstico de EAM, pois têm elevada especificidade e sensibilidade, são substâncias estáveis na corrente sanguínea, permanecem tempo considerável no sangue, e em condições normais surgem no plasma em baixas concentrações. Contudo, o aumento sérico das cTns pode ser devido a outras patologias, por isso é indispensável o contexto clínico e uma análise de todos os biomarcadores cardíacos paralelamente.³³

Atualmente, são utilizados ensaios de troponina de alta sensibilidade (*hs-cTn*), que permitem determinar baixas concentrações de troponinas cardíacas. O método utilizado na avaliação da *hs-cTnI* e *hs-cTnT* consiste num imunoensaio caracterizado por um baixo limite

de detecção e uma elevada sensibilidade, que consequentemente diminui a ocorrência de falsos resultados. Neste sentido, esta análise permite a detecção mais precoce dos níveis de cTn no plasma, o que possibilita excluir ou confirmar o diagnóstico de um EAM num estado muito prematuro. Deste modo, a diminuição do tempo de diagnóstico contribui para a redução da morbidade e mortalidade atribuída a esta patologia. A Sociedade Europeia de Cardiologia recomenda a realização da análise da *hs-cTnI* e *hs-cTnT* no momento da admissão hospitalar e a repetição após 3h, a fim de interpretar a cinética das troponinas para determinar se há aumento ou declínio dos valores do biomarcador. Caso se verifique o aumento do valor de cTn, e em conjunto com outros dados clínicos, é estabelecido o diagnóstico de EAM.³⁶

7.1.6. Outros doseamentos

Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é sintetizada no fígado. Esta é a proteína positiva de fase aguda mais sensível, assim sendo, o aumento da sua concentração plasmática verifica-se em variadas situações, nomeadamente em estados de inflamação, infeção, lesão tecidual e neoplasias.^{2:37}

A PCR de alta sensibilidade (*hs-PCR*) é uma técnica com limite de detecção mais baixo que os métodos convencionais, ou seja, permite a determinação de concentrações muito baixas de PCR. Desta forma, a *hs-PCR* é útil na avaliação do risco cardiovascular, pois o aumento ligeiro da concentração plasmática de PCR está associado ao processo aterosclerótico. Assim, o valor de *hs-PCR* correlaciona-se positivamente com o aumento do risco cardiovascular.^{2:37}

Glicose

A glicose é um hidrato de carbono derivado da dieta ou produzido endogenamente pelo fígado. Esta molécula é a principal fonte de energia para o organismo, como tal, o nível de glicose no sangue varia no decorrer do dia, consoante a ingestão de alimentos e o gasto de energia. A glicémia é regulada por hormonas produzidas no pâncreas, como a insulina e o glucagon.²

A hipoglicémia pode ser causada por doença hepática, insuficiência renal grave, septicémia, neoplasias, deficiência hormonal, deficiência nutricional, hiperinsulinémia devido a neoplasia pancreática, hiperinsulinémia devido a insulino-terapia excessiva, ou induzida por fármacos ou álcool.^{2:38}

A hiperglicémia está associada a anomalias no mecanismo de ação da insulina, sendo esta a causa mais comum de diabetes *mellitus*. A diabetes *mellitus* é uma desordem metabólica que consiste na incapacidade da regulação da glicémia.² O diagnóstico de diabetes *mellitus* é feito pela confirmação de um dos seguintes parâmetros enunciados na norma da Direção Geral de

Saúde (DGS): glicemia em jejum $\geq 126\text{mg/dl}$, ou glicemia ocasional $\geq 200\text{mg/dl}$ no caso de existir sintomas típicos de diabetes, ou glicemia $\geq 200\text{mg/dl}$ às 2h na prova de tolerância à glucose oral (PTGO)^h, ou hemoglobina glicada (HbA_{1c}) $\geq 6,5\%$.^{39,40}

A determinação analítica da glucose é dos parâmetros mais realizados na rotina laboratorial. Esta análise é realizada nos vários tipos de amostras, nomeadamente sangue, urina, LCR e outros fluídos biológicos. O doseamento da glucose sanguínea é essencial para o diagnóstico e monitorização da diabetes. A determinação da glucose no LCR é importante no diagnóstico de meningites bacterianas, pois há consumo de glucose pelos microrganismos e leucócitos. A glicosúria pode ocorrer devido a nefropatias ou como consequência de hiperglicemia. A glucose na urina é determinada numa amostra de urina de 24h, que deve ser conservada com ácido acético glacial para impedir a proliferação bacteriana e assim evitar o consumo da glucose.²

Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada A_{1c} (HbA_{1c}) é a fração principal das glicohemoglobinas. A alteração desta proteína ocorre devido à ligação irreversível entre a glucose e a cadeia β da hemoglobina. A HbA_{1c} reflete a glucose plasmática durante os últimos 3 meses, por isso é um ótimo indicador no diagnóstico, prognóstico e monitorização da diabetes, pois permite uma avaliação retrospectiva da glicemia.^{2,41} O doseamento da HbA_{1c} não necessita da colheita de sangue em jejum, por isso, é um parâmetro de eleição para o controlo dos doentes diabéticos.⁴¹ Esta análise é feita na amostra de sangue com EDTA através da técnica de HPLC. No caso de haver resultados anómalos, interferências ou presença de outras variantes de hemoglobina, é feita uma análise confirmatória por eletroforese capilar da hemoglobina.

^h PTGO consiste no doseamento da glicemia antes e após 2h da ingestão de uma solução com 75g de glucose. No diagnóstico de diabetes gestacionais nas grávidas, os doseamentos da PTGO são efetuados antes, 1 e 2h após a administração da solução.^{39,40}

8. Microbiologia

O setor de microbiologia está dividido nos seguintes sub-setores: bacteriologia, micobacteriologia, micologia, parasitologia e virologia.

O laboratório de microbiologia contém uma zona de receção de amostras, onde se confirmam as condições da amostra e se efetua a integração no sistema informático. Nesse momento são geradas as etiquetas de identificação com os respetivos meios de cultura para a sementeira, de acordo com o tipo de amostra biológica. Esta automatização no laboratório permite minimizar o erro pré-analítico.

A finalidade do diagnóstico microbiológico é detetar, identificar o agente patogénico, e, se possível, realizar o seu teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

8.1. Bacteriologia

As bactérias são organismos unicelulares procariotas, que interagem com o ambiente e o organismo humano. A microbiota humana é constituída por bactérias colonizadoras, que têm um papel fundamental na defesa do organismo contra agentes infecciosos. Contudo, em determinadas situações, como imunossupressão, as bactérias colonizadoras podem provocar doença ao hospedeiro, apresentando-se como bactérias oportunistas. Por outro lado, as bactérias patogénicas causam sempre infeção. Desta forma, é fundamental ter conhecimento acerca da microbiota normal associada a cada amostra, permitindo determinar o significado clínico das bactérias encontradas nas amostras biológicas.⁴²

O laboratório de bacteriologia tem como principal objetivo identificar a bactéria causadora da doença infecciosa. O procedimento laboratorial inclui a inoculação da amostra nos meios de cultura apropriados, e a sua incubação à temperatura e atmosfera adequada. Além disso, realiza-se um esfregaço para observação microscópica, de modo a orientar o diagnóstico e possível terapêutica empírica. Após o crescimento e isolamento bacteriano, realiza-se a identificação da bactéria no sistema automatizado MALDI Biotyper®, da Bruker. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) podem ser feitos de forma automatizada ou manual.

8.1.1. Exame microscópico

O exame microscópico permite avaliar a qualidade de determinadas amostras, orientar o diagnóstico e direcionar os procedimentos do exame cultural.⁴²

Exame a fresco

A preparação da lâmina para este exame consiste em colocar uma gota de soro fisiológico ou água na lâmina e fazer a suspensão da amostra. A observação desta preparação ao microscópio permite detetar a presença de elementos celulares e microrganismos.⁴³

Coloração de Gram

A coloração de Gram é a principal coloração em bacteriologia, pois permite diferenciar as bactérias consoante a estrutura da parede celular e a morfologia. A composição da parede celular das bactérias Gram-positivo (GP) contém uma grande quantidade de peptidoglicano com ligações de ácido teicóico, o que confere resistência à descoloração do álcool-acetona e assim retém o violeta de cristal. Por outro lado, as bactérias Gram-negativo (GN) têm uma parede celular constituída por uma fina camada de peptidoglicano e uma bicamada lipídica, que na presença do agente descolorante fica fragilizada, e por isso, perdem o primeiro corante e coram com o corante de contraste (safranina ou fucsina). Além da resposta à coloração de Gram, esta técnica permite, também, classificar as bactérias consoante a morfologia (cocos, bacilos) e agrupamentos bacterianos (diplococos, tétada). Todas estas características são essenciais na identificação das bactérias.⁴²

8.1.2. Exame cultural

O exame cultural baseia-se na inoculação da amostra nos meios apropriados, considerando o tipo de amostra e a análise solicitada pelo clínico. O objetivo da cultura *in vitro* consiste no crescimento e isolamento das bactérias, de modo a identificar a bactéria responsável pela possível infeção. As necessidades nutricionais e as condições ambientais condicionam o crescimento das diferentes bactérias, por isso é necessário adequar os meios de cultura aos requisitos das bactérias.⁴²

Meios de cultura

Os meios de cultura podem ser divididos em várias categorias, nomeadamente meios de enriquecimento, meios seletivos e meios diferenciais. Os **meios de enriquecimento** ou nutritivos não seletivos são meios que promovem o crescimento generalizado de todos os microrganismos. Estes meios contêm nutrientes que suportam o crescimento da maioria dos organismos sem dar vantagem a nenhum organismo em especial. Os **meios seletivos** promovem o desenvolvimento de um grupo específico de microrganismo. Estes meios são constituídos por substâncias que inibem o crescimento das outras bactérias. Por último, os **meios diferenciais** permitem a distinção e identificação dos microrganismos com base nas características metabólicas específicas de cada bactéria. A composição destes meios inclui substâncias que evidenciam essas diferenças.^{42,44} Na Tabela IV estão descritos os meios utilizados no laboratório de bacteriologia.

Tabela IV: Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do HUC.

Nome do meio		Descrição
Líquido	BHI (Brain Heart Infusion)	Caldo de enriquecimento não seletivo que permite o crescimento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos, bem como bactérias aeróbias e anaeróbias. ⁴²
	CBGN (Caldo de bacilos gram-negativo)	Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Shigella</i> spp. e <i>Salmonella</i> spp.. Este meio líquido é constituído por citrato e desoxicolato de sódio que impedem o crescimento da microbiota GI e bactérias GP. Também contém manitol, uma substância utilizada pela maioria dos organismos entéricos patógenos. ⁴²
	CM (Caldo Cooked Meat)	Meio de enriquecimento para cultivo e recuperação de microrganismos anaeróbios. Meio rico em aminoácidos e proteínas que promovem o desenvolvimento dos anaeróbios. ⁴⁵
Sólido (1,5% agar)	BCSA (Meio para <i>B. cepacia</i>)	Meio seletivo para o isolamento do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> , este meio contém sais biliares e antibióticos como gentamicina, ticarcilina e polimixina B. ⁴²
	CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina)	Meio seletivo e diferencial para isolamento de <i>Yersinia</i> spp. O meio é suplementado com antibióticos, cefsulodina e novobiocina, que inibem as bactérias GP, GN, e organismos da microbiota GI normal, assim como a presença de sais biliares e cristal violeta. O manitol presente no meio permite diferenciar as bactérias fermentadoras de manitol através do indicador de pH, vermelho neutro. ⁴²
	CLED (Cistina, lactose e deficiente em eletrólitos)	Meio não seletivo e diferencial, utilizado para o isolamento de agentes patogénicos presentes na urina, pois permite o crescimento da maioria dos organismos causadores de ITU. O meio permite diferenciar as colónias fermentadoras de lactose das não fermentadoras. A deficiência em eletrólitos impede o <i>swarming</i> provocado pelo <i>Proteus</i> spp.. ⁴⁶
	CNA (Agar Columbia com colistina e ácido nalidíxico)	Meio seletivo e diferencial para isolamento de cocos GP. O meio contém 5% de sangue, o que permite diferenciar as colónias de bactérias com base na ação hemolítica. Os antibióticos colistina e ácido nalidíxico impedem o crescimento dos bacilos GN (<i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Pseudomonas</i> spp.). ⁴²
	CAM (Meio para <i>Campylobacter</i>)	Meio seletivo para isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. O meio contém agentes antimicrobianos como vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B e cefalotina, que inibem a microbiota normal associada ao trato GI e bactérias GP. ^{42,45}
	Gelose de chocolate	Meio de enriquecimento, não seletivo preparado com sangue aquecido, que origina a lise dos glóbulos vermelhos, e isto permite a libertação de nutrientes como o fator X (hemina) e o fator V (nicotinamida adenina dinucleótido). Este suplemento do meio favorece o isolamento de microrganismos fastidiosos, como <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.. ⁴²
	Gelose de Sangue	Meio de enriquecimento e diferencial pois permite o crescimento de todas as bactérias. É possível diferenciar os microrganismos consoante o tipo de hemólise que realizam. ^{42,45}
	HAE (Meio para <i>Haemophilus</i> spp.)	Meio seletivo para <i>Haemophilus</i> spp., é constituído por gelose de chocolate e bacitracina, antibiótico que inibe o crescimento de bactérias GP, favorecendo o desenvolvimento de <i>Haemophilus</i> spp.. ⁴⁵
	Hektoen	Meio seletivo e diferencial para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.. Este meio contém sais biliares para impedir crescimento das bactérias GP e da microbiota GI. A presença da lactose e sacarose, permitem diferenciar as bactérias fermentadoras de lactose das não fermentadoras através dos indicadores de pH, azul de bromotimol e fucsina ácida. Além disso, também é possível diferenciar as bactérias produtoras de H ₂ S devido à presença do citrato férrico amoniacal e tiosulfato de sódio. ⁴²
	KV (Kanamicina e Vancomicina)	Meio seletivo para isolamento de microrganismos fastidiosos e crescimento lento e bactérias anaeróbicas. Este meio é composto por gelose de sangue e contém vitamina K e hemina, substâncias essenciais para o desenvolvimento de anaeróbios. A kanamicina e a vancomicina são antibióticos que inibem o crescimento de bactérias GP e favorecem a recuperação dos bacilos GN anaeróbios obrigatórios. ⁴⁵

MH (Muller-Hinton)	Meio não seletivo utilizado essencialmente para realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana manuais. ⁴⁵
MH-F (Muller-Hinton chocolate)	Meio mais nutritivo utilizado para a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana manual com microrganismo fastidiosos. ⁴⁵
NE	Meio seletivo para bactérias anaeróbicas não esporuladas.
PVX (PoliViteX)	Meio não seletivo constituído por gelose de chocolate suplementada com piridoxal (vitamina B ₆). Esta substância permite o crescimento de algumas espécies de <i>Streptococcus</i> spp., e de outros microrganismos mais fastidiosos como <i>Haemophilus</i> spp.. ⁴²
SCH (Schaedler)	Meio não seletivo para isolamento de anaeróbios estritos. Este meio é enriquecido com 5% de sangue e contém vitamina K ₁ , cistina, hemina e outros nutrientes. ⁴⁵
SGC2 (Sabouraud, gentamicina e cloranfenicol)	Meio seletivo para o isolamento de fungos. O cloranfenicol e a gentamicina inibem o crescimento das bactérias da microbiota associada à amostra. ⁴⁷
SMAC (MacConkey com sorbitol)	Meio seletivo e diferencial para isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> O157:H7. O meio de MacConkey com sorbitol permite diferenciar este serótipo de <i>E.coli</i> pois não têm capacidade de fermentar esta substância. ^{42,45}
SS (Meio para <i>Salmonella-Shigella</i>)	Meio seletivo e diferencial para isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Contém lactose e sais biliares que inibem o desenvolvimento das bactérias GP. Os microrganismos fermentadores de lactose e não fermentadores são distinguidos pelo indicador de pH, vermelho neutro. O citrato férrico amoniacal permite detetar a produção de H ₂ S, que origina colónias com centro negro. ^{42,45}
TSA (Trypticase de soja)	Meio não seletivo usado para o controlo de antibiograma, na generalidade das bactérias. ⁴⁵
TSS (Trypticase de soja com 5% de sangue carneiro)	Meio não seletivo que promove o crescimento de microrganismos fastidiosos. Também é utilizado para o controlo dos antibiogramas desses microrganismos. ⁴⁵
VCAT (Meio para <i>Neisseria</i> spp.)	Meio seletivo de isolamento para <i>Neisseria</i> spp.. Constituído por gelose de chocolate com adição de antibióticos, nomeadamente vancomicina, colimicina, anfotericina e trimetropim. Assim, inibe o crescimento das bactérias GN, bactérias GP e leveduras. ⁴⁵

Técnicas de inoculação

A inoculação dos meios de cultura com os produtos biológicos pode ser realizada por várias técnicas. A **técnica de esgotamento de produto** (Figura 3-A) é utilizada para a maioria das amostras biológicas em meios sólidos em placa. Esta técnica de sementeira é feita com uma ansa, e permite obter colónias isoladas. As amostras de urina são inoculadas nos meios sólidos pela **técnica de sementeira semi-quantitativa** (Figura 3-B). Esta inoculação é feita com uma ansa calibrada de 1 µL, de modo a semi-quantificar o número de colónias obtidas. Em amostras como o líquido cefalorraquidiano, realiza-se a inoculação por **inundação**, uma vez que os microrganismos estão presentes em quantidades reduzidas e devem ser sempre valorizados. Os cateteres são inoculados diretamente sobre a superfície do meio através da **técnica de sementeira por rolamento**. A execução de antibiogramas manuais requer um crescimento homogéneo em toda a placa. Assim, a inoculação da suspensão bacteriana realiza-se pela **técnica de sementeira em toalha**, com o auxílio de uma zaragatoa. Por fim, a inoculação das amostras em meios líquidos tem como finalidade o

crescimento e a recuperação de microrganismos, assim sendo, a inoculação é feita por **dispersão** diretamente no meio.

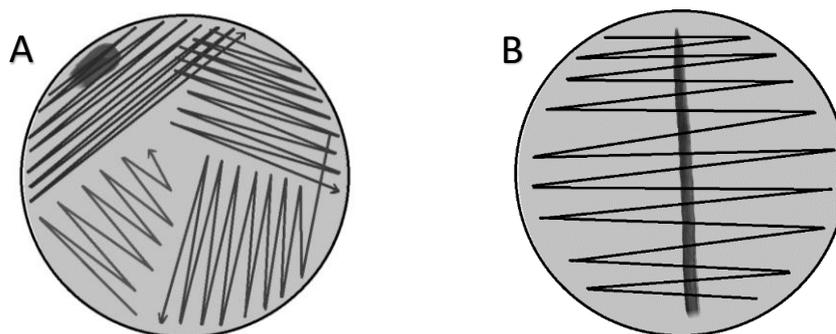


Figura 3: Representação esquemática da técnica de inoculação por (A) esgotamento de produto e por (B) sementeira semi-quantitativa. (Adaptado de Tille P., 2017)

Condições de incubação

As condições de incubação são essenciais para o crescimento bacteriano eficaz. A grande maioria das bactérias clinicamente significativas são anaeróbias facultativas, ou seja, têm a capacidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio. Alguns grupos de bactérias são estritamente aeróbicos e necessitam de uma atmosfera com oxigênio para crescer. As bactérias microaerófilas necessitam de níveis baixos de oxigênio. As bactérias anaeróbicas obrigatórias requerem a ausência de oxigênio para crescer devidamente. O teor de CO₂ também é importante no desenvolvimento dos microrganismos, sendo que, algumas bactérias necessitam de uma atmosfera de capnofilia, ou seja, concentrações de 5 a 10% de CO₂.^{42;44}

No isolamento de microrganismo anaeróbicos, as condições de colheita, transporte e processamento devem ser adaptadas para manter a viabilidade dos microrganismos. Inicialmente, estas amostras são inoculadas em gelose de sangue e no meio de Cooked Meat (CM). A cultura em CM deve ser repicada para os meios seletivos para o isolamento de anaeróbios, meio KV, meio SCH e meio NE. No meio SCH, na zona de maior inóculo coloca-se um disco de netilmicina, um antibiótico que não atua nas bactérias anaeróbicas. Assim, após a incubação, a presença de um halo de inibição ao redor do disco é sugestiva de crescimento de bactérias aeróbicas.⁴⁸ As placas de cultura são incubadas na câmara com atmosfera de anaerobiose, que contém um indicador de O₂.⁴⁴

A maioria das bactérias patogênicas crescem a temperaturas semelhantes à temperatura corporal do organismo humano, ou seja, entre 35 a 37°C. Assim sendo, a maioria das culturas são incubadas a 37°C durante 24h. Contudo, a temperatura de incubação pode ser usada como procedimento seletivo para a recuperação de alguns microrganismos. Por exemplo, a

Campylobacter jejuni tem capacidade de crescer a 42°C. Desta forma, a incubação a esta temperatura impede o crescimento da maioria das restantes bactérias presentes na amostra.⁴²

8.1.3. Identificação

A identificação definitiva dos microrganismos deve ser realizada pelo sistema de identificação automatizado disponível no laboratório, MALDI Biotyper®. Este equipamento utiliza a tecnologia MALDI-TOF, que se baseia em espectrometria de massa por dessorção-ionização a laser. A preparação da amostra inicia-se com a colocação de uma pequena porção de colónia isolada da bactéria de interesse na placa. No aparelho, a placa é submetida a um laser, que aplica uma dessorção-ionização na amostra, transformando-a em matéria volátil. As moléculas de diferentes massas e cargas movem-se a diferentes velocidades até atingirem o detetor do equipamento, que regista o tempo de chegada e a quantidade da substância. Esta informação é convertida num espectro de acordo com as proteínas de cada microrganismo. O padrão de proteínas é específico de cada espécie microbiana, e assim o *software* compara o espectro obtido com as informações da base de dados contida no sistema. Esta metodologia permite uma identificação rápida e eficiente dos microrganismos.^{49;50;51}

8.1.4. Teste de Suscetibilidades aos Antimicrobianos

A caracterização do microrganismo envolve a sua identificação e a sua resposta aos agentes antimicrobianos. Por isso, após a identificação do microrganismo, realiza-se o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), que tem como finalidade determinar possíveis resistências do agente patogénico perante a ação do antimicrobiano. Deste modo, o TSA fornece informações cruciais para a escolha da terapêutica mais adequada à doença infecciosa diagnosticada.⁴²

O *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) disponibilizam recomendações e orientações dos procedimentos, bem como as normas para interpretar os resultados dos antibiogramas.

O TSA é realizado geralmente pelo sistema automático MicroScan WalkAway, da Beckman Coulter, exceto para alguns microrganismos para os quais se realiza o TSA manual.

TSA Automático

O sistema automatizado para realização do TSA no laboratório de microbiologia é o MicroScan WalkAway, que tem disponível painéis de antibióticos predefinidos de acordo com o grupo de microrganismos, enunciados no Anexo III, Tabela VIII. Cada painel contém poços com determinados antibióticos em diferentes concentrações e 2 poços-controlo para validação do teste. O teste só é validado se houver crescimento nos poços-controlo.

O procedimento inicia-se com a preparação da suspensão bacteriana a partir de colónias de culturas puras em meios sem antibióticos, que se misturam com o soro desagregante. A suspensão é inoculada em todos os poços do painel, com um dispositivo que permite inocular todos os poços ao mesmo tempo. O painel é incubado a 35°C no sistema automático, que faz uma leitura inicial e volta a ler após 1h e ao fim de 18h, de modo a avaliar o crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano é avaliado por turbidimetria, e assim é determinado o valor da concentração mínima inibitória (CMI), que consiste na concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento bacteriano. Este resultado é interpretado pelo sistema como resistente, intermédio ou suscetível.^{42;52;53} Além disso, faz-se o controlo da suspensão bacteriana na gelose de tripticase de soja (TSA) ou tripticase de soja com sangue (TSS) para organismos mais fastidiosos.

TSA Manual

O antibiograma manual é realizado nas seguintes situações: determinado antibiótico não está disponível no painel; confirmação do resultado obtido no sistema automático; ou uma estirpe bacteriana mais fastidiosa e com crescimento mais lento.

O TSA manual pode ser realizado através do método em difusão de disco ou tiras *E-test*. O procedimento para ambos os testes, inicia-se com a preparação da suspensão bacteriana (suspende-se colónias isoladas de um meio não seletivo numa solução de soro fisiológico, obtendo-se um inóculo com uma densidade equivalente a 0,5 McFarland). Esta é inoculada no meio Muller-Hinton (MH) pela técnica de sementeira em toalha, de modo a obter um crescimento homogéneo por toda a placa. No caso de serem bactérias fastidiosas, como *Haemophilus influenza*, utiliza-se o meio Muller-Hinton suplementado com gelose de chocolate (MH-F), para promover o crescimento destes organismos. Após a aplicação do antibiótico, as placas devem ser incubadas a 37°C durante 24h, numa atmosfera de aerobiose no caso de MH, ou numa atmosfera de capnofilia para o meio MH-F. O controlo da suspensão bacteriana é feito pela inoculação no meio MH ou MH-F pela técnica de esgotamento de produto.^{45;54}

I. Difusão de disco

O teste por difusão em disco é baseado no método de Kirby-Bauer. Os discos contêm antibiótico impregnado e são aplicados sobre a superfície da placa previamente inoculada com a suspensão bacteriana. A aplicação dos discos deve respeitar uma distância mínima entre os mesmos, de forma a evitar a sobreposição dos halos de inibição. Quando o disco entra em contacto com a gelose, o antibiótico começa a difundir-se no meio, formando um gradiente de concentração. Após a incubação, há crescimento bacteriano e assim torna-se possível medir o diâmetro dos halos de inibição em redor dos discos. A medida do diâmetro em milímetros

permite a interpretação de acordo com as tabelas disponíveis no EUCAST, e assim classificar o microrganismo como suscetível, intermédio ou resistente, em relação ao antibiótico em questão.⁵⁴

2. E-test

A aplicação das tiras *E-test* é semelhante ao procedimento do método por difusão de disco, descrito em cima. As tiras *E-test* contêm impregnado um gradiente de concentração do antibiótico, e a respetiva escala de concentração do agente antimicrobiano, o que permite determinar o valor de CMI. Após a incubação, é possível verificar uma zona inibitória, com a forma de elipse. A leitura da CMI é feita no ponto de interseção da tira com a zona que delimita a área de inibição.⁴²

8.1.5. Amostras biológicas

A análise bacteriológica pode ser feita numa grande variedade de produtos biológicos. Os procedimentos nas amostras mais comuns no laboratório são descritos em seguida.

1. Urina

A amostra de urina é uma das amostras mais frequentes no laboratório, uma vez que as infeções do trato urinário (ITU) são muito comuns. Estas ocorrem com mais frequência em mulheres, devido à anatomia, pois a uretra é mais curta e localiza-se mais perto da zona perianal, o que facilita a entrada dos microrganismos por via ascendente. Contudo, a incidência desta infeção aumenta nos homens com a idade, e tem grande prevalência em grupos de risco como grávidas, pacientes imunocomprometidos, pacientes com anomalias no trato urinário e com sondas vesicais.⁴²

O quadro clínico de uma ITU é muito variável e depende da zona do sistema urinário afetada. A cistite é a mais comum e está associada à infeção do trato urinário inferior, envolvendo a bexiga. A pielonefrite é mais grave, porque envolve o trato urinário superior e pode condicionar a função do rim.^{42;44}

O diagnóstico laboratorial de ITU baseia-se na realização de uma urocultura, que pode ser complementada com a análise sumária de urina.

Normalmente, a colheita de urina é realizada pelo próprio paciente, após uma higienização da zona genital, a fim de evitar a contaminação da amostra. No entanto, a colheita pode ser obtida de outras formas, nomeadamente, por nefrostomia, saco coletor, punção de cateter ou aspiração suprapúbica.^{43;47;55}

No transporte para o laboratório, a urina está contida num tubo esterilizado com ácido bórico, para impedir a multiplicação das bactérias. Na chegada ao laboratório, a amostra de

urina é processada no equipamento automatizado UF-5000™ da Sysmex, que consiste num analisador de partículas, baseado no princípio de citometria de fluxo fluorescente. Este sistema fornece a contagem e diferenciação dos elementos, nomeadamente, leucócitos, glóbulos vermelhos, células epiteliais, bactérias e leveduras.^{56;57;58}

A urocultura realiza-se pela técnica de sementeira semi-quantitativa em dois meios de cultura, no meio CLED e na gelose de sangue. Ambos os meios são incubados a 37°C durante 18 a 24h, numa atmosfera de aerobiose.^{55;43} Após a incubação, as placas são observadas e avaliadas semi-quantitativamente, como descrito na Tabela V. Após essa avaliação, é observada a morfologia das colónias em uroculturas positivas, de modo a identificar o agente etiológico e, se possível, realizar o TSA.⁴⁴

Tabela V: Classificação da avaliação semi-quantitativa das uroculturas.

	Resultado	Procedimento
Sem crescimento	Negativo	
<10 ⁴ (1 a 10 colónias)	Significado clínico depende da história clínica	Identificação e TSA (de acordo com a história clínica)
10 ⁴ – 10 ⁵ (10 a 100 colónias)	Positivo consoante história clínica/sumária de urina	Identificação e TSA (de acordo com a história clínica)
>10 ⁵ positiva (>100 colónias)	Positivo	Identificação e TSA
≥3 tipos de colónias	Polimicrobiano (Urina contaminada)	Rejeitar amostra e sugerir nova colheita

As amostras pediátricas, além de inoculadas nos meios descritos acima, são inseridas no sistema automatizado HB&L UROQUATTRO, desenvolvido pela Alifax. Estas amostras são inoculadas em caldos de cultura constituídos pelo meio de Muller-Hinton, e são incubadas a 37°C. O sistema monitoriza o crescimento bacteriano e fornece curvas de crescimento em tempo real, através da metodologia baseada na dispersão de luz, o que permite orientar o diagnóstico.^{59;60}

A maioria das ITU têm como agente etiológico a *Escherichia coli*, além de outros exemplos como *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.^{44;47}

2. Fezes

O trato gastrointestinal (GI) apresenta uma microbiota normal composta por uma grande variedade de microrganismos. Por essa razão, as fezes são um produto muito abundante em microrganismos, e por isso é difícil isolar o agente etiológico. Como tal, utilizam-se meios seletivos para favorecer o crescimento das bactérias enteropatogénicas e impedir o crescimento de outras bactérias.⁴²

O exame cultural de fezes consiste na pesquisa de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., no qual as amostras de fezes são inoculadas nos meios Hektoen, SS e no caldo de bacilos GN. Este último é um meio líquido de enriquecimento para recuperação dos microrganismos, que necessita de ser repicado para os meios Hektoen e SS após 18h de incubação.⁴³ Estes meios são incubados a 37°C durante 18 a 24h, em atmosfera normal. Os meios utilizados permitem o crescimento dos bacilos GN e contêm propriedades diferenciais. A lactose presente nestes meios sólidos permite diferenciar as bactérias fermentadoras e não fermentadoras, sendo que estas duas espécies não fermentam lactose (colônias incolores). Além disso, o citrato férrico amoniacal presente nos meios sólidos permite detetar a produção de H₂S por parte da *Salmonella* spp. (colônia incolor com centro preto), o que a diferencia da *Shigella* spp.⁴⁷

Outros microrganismos também podem ser pesquisados nas fezes, tais como, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*, utilizando os meios CIN e CAM, respetivamente. O meio para isolamento *Yersinia* spp. é incubado numa atmosfera aeróbia a uma temperatura de 37°C durante 18 a 24h. A gelose para pesquisa de *Campylobacter* spp., é incubada a 42°C durante 48h em atmosfera de microaerofilia.^{44;47}

Nas amostras pediátricas é realizada, adicionalmente, a pesquisa da *Escherichia coli* enterohemorrágica (serótipo O157:H7), para a qual a amostra é inoculada no meio SMAC. O meio é incubado numa atmosfera aeróbica a uma temperatura de 37°C durante 24h.^{43;55}

Algumas gastroenterites são provocadas por toxinas produzidas por determinadas bactérias, como a *Clostridium difficile*. Deste modo, realiza-se pesquisa dos genes codificantes da toxina através de métodos de biologia molecular (GeneXpert).

3. Sangue

A presença bactérias na corrente sanguínea, denomina-se de bacteriemia. As hemoculturas são cruciais para o diagnóstico de bacteriemia e identificação do agente patogénico.^{42;43}

O sangue é um líquido estéril, por isso valoriza-se qualquer microrganismo isolado a partir de uma hemocultura. Contudo, nem todas as hemoculturas positivas são indicativas de infeção. No momento da colheita podem ocorrer contaminações com microrganismos comensais da pele, então, é essencial que a colheita seja realizada de acordo com as recomendações dadas no manual de boas práticas do laboratório. A colheita para uma hemocultura inicia-se com a desinfeção da pele no local da punção venosa, para evitar contaminações com a microbiota da pele. A colheita de sangue é realizada em dois locais diferentes para frascos de hemoculturas. Os frascos contêm um meio de cultura, e deve ser respeitada a relação meio de cultura/volume de sangue, para aumentar a recuperação de microrganismos. Nos adultos, o

volume de sangue recomendado para a hemocultura são 10 a 30 mL, e nas crianças o volume de sangue deve ser adequado ao peso da criança.^{43;45;55}

No laboratório, os frascos de hemoculturas são inseridos no sistema automatizado BacT/ALERT®, da bioMérieux, e ficam incubados a 37°C. Este equipamento permite a monitorização contínua do crescimento microbiológico através da leitura do sensor que se encontra no fundo de cada garrafa. O sensor colorimétrico altera a cor consoante a alteração do pH, portanto, quando há crescimento bacteriano, há um aumento da produção de CO₂ pelos microrganismos, o que leva à diminuição do pH.⁴² As hemoculturas sem crescimento apenas são consideradas negativas após 5 dias de incubação.

As hemoculturas positivas são repicadas para GS e é feito um esfregaço para coloração de Gram. A GS é incubada a 37°C, numa atmosfera de capnofilia. Caso não se verifique crescimento bacteriano, pode suspeitar-se de um microrganismo fastidioso ou um microrganismo anaeróbio. Portanto, é realizada a inoculação de sangue em duas placas de PoliViteX, que são incubadas em atmosfera capnofílica e em atmosfera de anaerobiose. A observação microscópica do esfregaço permite orientar o clínico para uma terapêutica empírica.

Bactérias como *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* podem ser isoladas nas hemoculturas positivas.⁴⁵

O sistema Accelerate Pheno® é utilizado para identificar o microrganismo e realizar o respetivo TSA diretamente de hemoculturas positivas. Este sistema permite reduzir o tempo de resposta, visto que a identificação é feita num período máximo de 2h e o TSA demora cerca de 7h. O aparelho utiliza a combinação de duas técnicas, electrofiltração em gel e *fluorescent in situ hybridization* (FISH).⁶¹ Ainda assim, realiza-se a cultura tradicional em simultâneo.

4. Produtos do trato respiratório

O trato respiratório divide-se em trato respiratório superior e trato respiratório inferior. O trato respiratório superior é constituído pela cavidade nasal, nasofaringe, orofaringe e laringofaringe, e é colonizado por uma microbiota normal muito diversificada. Pelo contrário, o trato respiratório inferior não tem microbiota associada. Desta forma, na interpretação dos resultados deve ser tido em conta o tipo de amostra.^{42;55}

As principais bactérias patogénicas responsáveis por infeções do trato respiratório são *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Pseudomonas aeruginosa*.^{43;55}

A expetoração é uma amostra que está frequentemente contaminada com saliva e microbiota do trato superior. Deste modo, é essencial avaliar a qualidade da amostra no exame microscópico. Após a coloração de Gram, o esfregaço deve ser observado ao microscópio ótico numa objetiva de 10x, e avaliado através do número de células epiteliais, número de leucócitos e tipo de flora. Na Tabela VI está apresentada a classificação da observação microscópica e a respetiva contagem de células por campo. A qualidade da amostra é definida com base nesta análise microscópica, assim sendo, as amostras com mais de 25 células epiteliais por campo são consideradas contaminadas com saliva, pelo que devem ser rejeitadas. A avaliação da quantidade de leucócitos pode ser transponível para a ocorrência de infeção, ou seja, a presença de mais de 25 leucócitos por campo é sugestiva de uma doença infecciosa. A avaliação do tipo de flora consiste na observação da predominância do microrganismo.^{43,42}

Tabela VI: Classificação da avaliação do exame microscópico das amostras respiratórias.

Classificação	Células epiteliais	Classificação	Leucócitos
1 (raras)	<10 por campo	1 (raros)	<10 por campo
2 (algumas)	10 – 25 por campo	2 (alguns)	10 – 25 por campo
3 (muitas)	>25 por campo	3 (muitos)	>25 por campo

O aspirado brônquico e o lavado bronco-alveolar (LBA) são amostras obtidas através de métodos invasivos. A colheita do aspirado brônquico é feita nos bronquíolos, enquanto que a colheita do LBA é feita com soro fisiológico nos alvéolos. O processamento das amostras inicia-se com a realização de um esfregaço para a coloração de Gram, que é observado ao microscópio para avaliar a qualidade das amostras. Consideram-se amostras com boa qualidade, as que apresentam células brônquicas, poucas células do epitélio da mucosa oral e pouca flora associada.⁴²

A inoculação das amostras é feita na GS e no meio HAE (meio para isolamento de *Haemophilus* spp.), que são incubados a 37°C durante 24 a 48h em atmosfera de aerobiose. No caso de serem pacientes diagnosticados com Fibrose Quística (FQ) ou Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC), a expetoração, o aspirado brônquico e o LBA devem ser inoculados também nos meios BCSA e SGC2, para a pesquisa de *Burkholderia cepacia*, e pesquisa de fungos, respetivamente. Estes doentes crónicos são mais suscetíveis de desenvolverem infeções respiratórias, por isso é necessário monitorizar os microrganismos colonizadores do trato respiratório.^{42,43}

5. Exsudados vaginais e exsudados uretrais

O trato genital feminino e masculino são habitualmente colonizados por bactérias comensais, que contribuem para a defesa contra infecções. A microbiota normal do trato genital feminino é predominantemente constituída por *Lactobacillus* spp. A composição da microbiota é influenciada por fatores como: pH, equilíbrio hormonal e dieta, que sofrem alterações com a idade. O desequilíbrio de algum destes fatores pode resultar na alteração da microbiota, provocando uma infecção endógena. Por outro lado, as infecções exógenas são provocadas por doenças sexualmente transmissíveis (DSTs).⁴² Alguns dos agentes patogénicos pesquisados nos exsudados vaginais e uretrais são *Clamidia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Trichomonas vaginalis*, e *Ureaplasma* spp..^{45;55}

A colheita da amostra é feita com zaragatoa, que é colocada num meio de transporte que mantém as boas condições da amostra, e deve ser processada num período de 2h para garantir a viabilidade do possível agente patogénico. O exame a fresco do esfregaço permite detetar a presença de *Trichomonas vaginalis*. No exame microscópico do esfregaço corado por coloração de Gram são avaliadas as células epiteliais, leucócitos e o tipo de microbiota associada ao local da colheita. A amostra é inoculada pela técnica de esgotamento de produto na GS, no meio VCAT e no meio CNA. O meio VCAT é adequado para o isolamento seletivo da *Neisseria gonorrhoeae*, o meio CNA permite o isolamento cocos Gram positivo. As placas são incubadas a 37°C durante 18 a 24h, em atmosfera de capnofilia.⁴³

A pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* é feita através de um kit, que distingue as duas espécies através da identificação bioquímica, e permite fazer o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.⁶²

6. Exsudados de feridas, aspirados e exsudados profundos

As infecções em feridas e abscessos podem envolver muitos microrganismos, pois dependem do local anatómico da infecção, o tipo de infecção e a história clínica. Os exsudados de feridas superficiais são colhidos por zaragatoa após a limpeza do local da ferida. O pus de abscesso, exsudados purulentos e aspirados de feridas são colhidos por aspiração em condições de assepsia. As amostras são processadas de forma semelhante, sendo feito um esfregaço para coloração de Gram, e a inoculação da GS através da técnica de esgotamento do produto. Além disso, o pus de abscesso, os exsudados purulentos e os aspirados de feridas são inoculados no Cooked Meat, pois este meio permite a recuperação de anaeróbicos, cuja presença é frequente neste tipo de amostras. Após a incubação a uma temperatura de 37°C durante 24h, as primoculturas são observadas e repicadas de acordo com o microrganismo

que se pretende isolar. As bactérias que podem ser responsáveis por este tipo de infeções incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* beta-hemolítico.^{42;45}

7. Líquido Cefalorraquidiano

O cérebro e a medula espinhal constituem o sistema nervoso central (SNC), que é protegido por estruturas ósseas, barreira hematoencefálica e meninges, onde circula o líquido cefalorraquidiano (LCR), fornecendo também uma ação protetora. A barreira hematoencefálica é uma defesa essencial contra a entrada dos microrganismos no SNC.⁴² A infeção do SNC pode ser designada por encefalite, meningite ou meningoencefalite, dependendo da zona afetada, ou seja, corresponde à inflamação do encéfalo, das meninges e de ambos, respetivamente. Estas infeções são consideradas emergências médicas, por isso requerem um diagnóstico precoce.^{55;63}

A análise do LCR é essencial para o diagnóstico das infeções do SNC, e a sua colheita é realizada através de punção lombar. O transporte para o laboratório deve ser imediato, e a amostra deve ser mantida à temperatura ambiente. No laboratório, a amostra é observada macroscopicamente para avaliar a turbidez e cor do LCR, este é centrifugado (10min 2500 rpm), obtendo-se o sedimento que é inoculado por inundação na GS, no meio PVX e no meio líquido BHI, e é realizado um esfregaço para coloração de Gram. Os meios são incubados a 37°C durante 24 a 72h. Além da análise microbiológica, o LCR é submetido à análise bioquímica e citológica, onde se avalia a concentração de glicose, quantidade de proteína, contagem de leucócitos e o tipo de células predominantes. Estes resultados fornecem informações cruciais para a interpretação da análise microbiológica.^{42;43;45;64}

Alguns dos agentes bacterianos responsáveis por meningites e/ou encefalites são: *H.influenzae*, *Listeria monocytogenes* *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*.^{55;64}

8. Outros líquidos

Os líquidos contidos nas cavidades corporais são normalmente estéreis, por isso o isolamento de qualquer microrganismo deve ser valorizado. As infeções nestes locais levam ao aumento da quantidade de líquido, e podem ser provocadas por uma grande variedade de microrganismos. A colheita destas amostras é realizada por aspiração em condições assépticas. Além do diagnóstico microbiológico, é feita a análise bioquímica e citológica.^{42;43}

Líquido Pleural

O líquido pleural reveste a cavidade torácica, entre o pulmão e a parede torácica.⁴² A análise microbiológica desta amostra inicia-se com a inoculação na GS, no meio PVX e no meio líquido

BHI, e é realizado o esfregaço para coloração de Gram. Os meios são incubados a 37°C durante 24 a 48h.

Líquido Peritoneal

O líquido peritoneal está contido cavidade peritoneal, localizada no abdómen. Num processo inflamatório, o líquido é acumulado na cavidade peritoneal e gera uma condição designada de ascite.⁴² O líquido peritoneal é inoculado na GS e no meio líquido Cooked Meat, para recuperação de bactérias anaeróbicas. São incubados a 37°C durante 24 a 48h. Realiza-se ainda o esfregaço para a coloração de Gram.

Líquido Sinovial

O líquido sinovial encontra-se no espaço articular, e desempenha uma função de lubrificante, permitindo o movimento das articulações. Este líquido contém ácido hialurónico, o que dificulta o procedimento de análise desta amostra.⁶⁵ Esta amostra também é inoculada nos meios GS, PVX e BHI, que são incubados a 37°C durante 24 a 48h. Também é realizado um esfregaço para coloração de Gram.

9. Cateter

Os cateteres são usualmente utilizados no auxílio de tratamentos em ambiente hospitalar. Contudo, são dispositivos médicos suscetíveis a colonizações por parte de microrganismos, originando um processo infeccioso. Por esta razão, são objetos enviados frequentemente para o laboratório do CHUC. A inoculação do cateter na GS é feita pela técnica de rolamento, e posteriormente é colocado o cateter no meio BHI. Ambos são incubados a 37°C durante 24 a 48h.⁴²

8.2. Micobactérias

As micobactérias são um grupo de bactérias aeróbicas estritas e imóveis. A estrutura da parede celular é constituída por ácidos micólicos, que conferem elevada impermeabilidade hidrofóbica, e como consequência, um crescimento muito lento. Estes organismos são denominados por bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), pois, após a coloração, as micobactérias têm a capacidade de resistir à descoloração com ácido-álcool.^{42;47}

As espécies de micobactérias que provocam tuberculose nos humanos pertencem ao *Mycobacterium tuberculosis complex*. Este grupo engloba *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae*, entre outras espécies. A tuberculose é atualmente um problema de saúde pública, devido ao elevado risco de desenvolver infeção após a inalação de aerossóis contaminados, especialmente em indivíduos

imunocomprometidos. Por essa razão, os laboratórios para pesquisa de micobactérias necessitam do nível 2 de biossegurança.^{42;66}

A pesquisa de micobactérias é realizada numa grande variedade de amostra, nomeadamente, produtos do trato respiratório (expetoração, aspirado brônquico, LBA), sangue, LCR, urina, fezes, suco gástrico, líquido pleural e biópsias. A colheita das amostras de expetoração deve ser realizada durante 3 dias consecutivos, visto que a emissão dos BAAR não é contínua e pode ser reduzida.

8.2.1. Processamento das amostras

O processamento da maioria das amostras implica uma descontaminação, homogeneização e concentração da amostra. A descontaminação das amostras permite eliminar a microbiota associada e destruir material proteico, de modo a facilitar a pesquisa dos BAAR. No processo de descontaminação é utilizada uma solução de N-acetil-L-cisteína (NALC), citrato de sódio e NaOH. O reagente NALC-NaOH é um agente mucolítico, e o citrato de sódio impede a inativação do NALC, ao ligar-se aos metais pesados presentes na amostra. O pH alcalino da solução também contribui para a destruição da microbiota. Posteriormente, é adicionado solução tampão para neutralizar a reação. A solução é submetida à centrifugação (15min 3000xg) para concentrar a amostra. O sedimento resultante da centrifugação é utilizado para inocular os meios de cultura e realizar o esfregaço para coloração de Kinyoun.^{42;67}

Existem algumas exceções neste procedimento, como o LCR, que não necessita de descontaminação. Esta amostra é submetida diretamente ao processo de centrifugação.

As amostras líquidas, como a urina, são inicialmente centrifugadas, e só depois se realiza a descontaminação.

As amostras de fezes contêm muitos microrganismos, e por isso a descontaminação torna-se difícil, então, esta amostra é sujeita a um pré-tratamento antes da descontaminação. Realiza-se uma suspensão das fezes em água destilada, a qual é filtrada com uma gaze. Em seguida, a solução obtida prossegue para a descontaminação descrita inicialmente.

No caso das biópsias e placentas, é feito um enriquecimento prévio no meio líquido *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT), que é incubado a 37°C durante 24h. Após esse período, o meio líquido é centrifugado e o sedimento é processado conforme descrito inicialmente.

As amostras de sangue estão contidas nos frascos de hemoculturas, que são inseridas diretamente no sistema BACTEC™ 9120™.

8.2.2. Exame microscópico

Os métodos de coloração aplicados às micobactérias são, geralmente, a coloração de Ziehl-Neelsen e a coloração de Kinyoun, que consiste numa modificação do primeiro método. O primeiro corante em ambas as técnicas é a fucsina concentrada. Na coloração de Kinyoun, este corante está associado a uma elevada concentração de fenol, de modo a facilitar a permeação do corante na parede celular das micobactérias, e assim, não necessita da aplicação de calor. Pelo contrário, a técnica de Ziehl-Neelsen requer o aquecimento da lâmina nesta primeira etapa. Posteriormente, sucede-se a lavagem com o agente descolorante, ácido-álcool, que retira o corante de tudo, exceto dos BAAR. As micobactérias ficam coradas de rosa, e após a adição do segundo corante, azul de metileno, tudo o resto fica corado de azul.⁴²

No exame microscópico é possível distinguir as micobactérias das outras bactérias e células. A visualização de apenas um bacilo ácido-álcool resistente é significativa.

8.2.3. Exame cultural

Após o processamento, as amostras são inoculadas no meio MGIT e no meio Löwenstein-Jensen (LJ). A utilização de dois meios de cultura promove a recuperação e deteção das micobactérias.

O meio líquido MGIT é constituído por um caldo nutritivo Middlebrook 7H9 suplementado com uma mistura de antibióticos composta por polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina (PANTA). A composição do meio favorece o crescimento das micobactérias, e a solução PANTA inibe o crescimento dos microrganismos da microbiota normal.^{68;69}

O meio MGIT é incubado a 37°C no equipamento BACTEC MGIT 960, um sistema automático que monitoriza o crescimento de micobactérias. O meio contém um composto fluorescente sensível à alteração da concentração de oxigénio. Assim, quando há crescimento bacteriano, existe consumo de oxigénio, e conseqüentemente o sensor emite fluorescência. Desta forma, o equipamento BACTEC MGIT 960 identifica as culturas positivas através da deteção de fluorescência.^{42;67;68}

As culturas positivas do meio MGIT são confirmadas a partir da realização de um esfregaço para coloração de Ziehl-Neelsen. Além disso, a cultura é inoculada num meio GS, de modo a garantir que a positividade não é devida a uma bactéria contaminante.

O meio sólido Löwenstein-Jensen é utilizado para o isolamento e diferenciação das micobactérias. Este meio contém verde de malaquite e sais minerais, os quais inibem o crescimento dos microrganismos contaminantes.⁴⁷

As amostras inoculadas no meio LJ são incubadas a 37°C, durante 6 semanas. Este meio permite uma observação macroscópica das colónias, o que fornece informações essenciais para a identificação da *Mycobacterium tuberculosis*.⁴²

No caso das hemoculturas para pesquisa de *Mycobacterium* spp., é utilizado o sistema BACTEC™ 9120™, que permite a deteção rápida de culturas positivas. As garrafas de hemocultura contêm meio de cultura não seletivo BHI e meio Middlebrook 7H9. No fundo de cada garrafa existe um sensor de fluorescência sensível à concentração de CO₂. O aumento da intensidade de fluorescência é proporcional ao crescimento de microrganismos, e isto deve-se à diminuição do O₂ e ao aumento da concentração de CO₂ resultantes do metabolismo das micobactérias.^{70:71}

As garrafas de hemoculturas são incubadas a 35°C no equipamento BACTEC™ 9120™, e este permite uma monitorização contínua do crescimento bacteriano ao fazer uma leitura do sensor a cada 10 minutos. Desta forma, é possível uma deteção célere das hemoculturas positivas.^{70:72}

8.2.4. Antibiograma para micobactérias

O teste de suscetibilidade antimicrobiana para micobactérias é realizado no equipamento BACTEC MGIT 960. Este aparelho monitoriza o crescimento das micobactérias, mas neste caso compara o tubo controlo (sem antibiótico) com os tubos que contêm antibióticos. São testados antimicrobianos de primeira linha, estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida.⁴²

8.3. Parasitologia

As doenças parasitárias são mais prevalentes em determinadas regiões do planeta, principalmente em regiões tropicais. Contudo, as alterações ambientais e o aumento das viagens contribuem para uma distribuição generalizada destas doenças. Além disso, o aumento de doentes imunocomprometidos tem como consequência o aumento da suscetibilidade a infeções parasitárias, principalmente por parasitas oportunistas. Todos estes fatores contribuem para o aumento do estudo das doenças parasitárias.^{42:73:74}

Em parasitologia, o diagnóstico laboratorial realiza-se principalmente pela observação macroscópica e microscópica das amostras biológicas. Por isso, é essencial o conhecimento morfológico das espécies de parasitas possíveis de causar infeção.^{42:65}

A pesquisa de parasitas é realizada em vários tipos de amostras, contudo a mais solicitada é a pesquisa de parasitas nas fezes.

O exame parasitológico de fezes inicia-se com a observação macroscópica, a fim de examinar a consistência das fezes, bem como a presença de muco, sangue ou parasitas/fragmentos de parasitas macroscópicos. De seguida, a amostra é processada através do kit comercial ParasiTrap[®], baseado no método de Ritchie. O sedimento fecal obtido pela técnica de concentração é observado ao microscópio para pesquisa de ovos ou quistos. A visualização de apenas uma estrutura parasitária permite o diagnóstico laboratorial.

Alguns dos parasitas que podem provocar infecções GI parasitárias podem ser *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia* spp. e *Trichuris trichiura*.^{42;47}

O exame parasitológico sanguíneo também é frequentemente realizado no laboratório. Alguns dos parasitas patogénicos encontrados no sangue podem ser *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp., *Toxoplasma gondii* e *Loa loa*.^{42;47}

No caso da malária, o agente patogénico é o *Plasmodium* spp., nomeadamente *Plasmodium vivax*, *P.falciparum*, *P.malariae* e *P.ovale*.⁶⁵

No diagnóstico da malária são feitas duas preparações para observação microscópica: gota espessa e esfregaço sanguíneo. Ambas as preparações são coradas pela coloração de Giemsa. Na gota espessa há lise de eritrócitos, o que permite um aumento da sensibilidade na deteção do parasita. No esfregaço sanguíneo, a amostra está íntegra, e por isso é mais fácil identificar a espécie de *Plasmodium* spp.. Na Figura 4 são apresentados alguns exemplos de espécies de *Plasmodium* spp. em diferentes estadios de evolução.

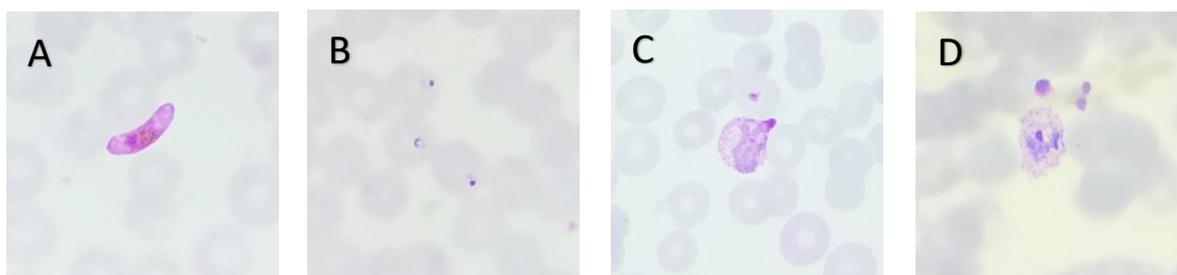


Figura 4: **A)** Gametócito de *Plasmodium falciparum*; **B)** Trofozoíto de *Plasmodium falciparum*; **C)** Trofozoíto de *Plasmodium vivax*; **D)** Trofozoíto de *Plasmodium ovale*.

8.4. Micologia

Os fungos são organismos eucariotas, constituídos por uma parede celular composta essencialmente por quitina e ergosterol. Os fungos clinicamente relevantes são classificados em leveduras, fungos filamentosos e dimórficos. O dimorfismo consiste na manifestação de diferentes formas consoante a temperatura, ou seja, os fungos dimórficos patogénicos para o Homem assumem uma forma leveduriforme quando se encontram no organismo humano

(37°C), e apresentam uma forma filamentosa num ambiente com uma temperatura mais baixa (25°C).

Atualmente, a maioria das infeções fúngicas diagnosticadas no laboratório são provocadas por fungos não patogénicos, em indivíduos imunocomprometidos,. Uma pequena parte das infeções fúngicas são provocadas por fungos patogénicos, como *Histoplasma capsulatum*. Contudo, estas infeções estão restritas a determinadas regiões geográficas.^{42;47}

O diagnóstico laboratorial de infeções fúngicas implica o isolamento e a identificação do fungo responsável pela patologia. As amostras biológicas, como produtos do trato respiratório, sangue, LCR, cabelo e unhas, são inoculadas no meio SGC2. As condições de incubação das culturas dependem do tipo de amostra e do pedido do clínico, assim sendo, normalmente a incubação é feita a 30°C numa estufa com humidade, mas em caso de suspeita de dermatófitos o meio de cultura é incubado a 25°C. A maioria dos fungos tem crescimento lento, e por isso, a duração da incubação varia consoante o tipo de fungo, podendo demorar 4 semanas a crescer.⁴²

A identificação do fungo é feita com base na observação macroscópica e microscópica das colónias. Na observação macroscópica das colónias, devem ser consideradas características, como a textura, pigmentação, tempo de crescimento, entre outras. Para a observação microscópica, coloca-se uma porção da colónia na lamela com azul de lactofenol, esta coloração permite preservar as estruturas e observar morfologia dos esporos, hifas e o tipo de reprodução assexuada, de modo a auxiliar na identificação do fungo.⁴²

O fungo isolado nem sempre corresponde ao agente patogénico, pois pode ser um microrganismo da microbiota normal ou um contaminante. Desta forma, é importante interligar os resultados obtidos das culturas com a história clínica.

8.5. Virologia

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, uma vez que necessitam de infetar as células para se multiplicarem. A estrutura viral é constituída por uma molécula de ácido nucleico (ácido ribonucleico (RNA) ou ácido desoxirribonucleico (DNA)), que é envolvida por uma cápside. Além disso, alguns vírus são compostos por um envelope, estes são mais sensíveis às condições ambientais, contrariamente aos vírus nus, que são mais resistentes por não conterem envelope.^{42;45}

O laboratório tem um papel fundamental no diagnóstico precoce das infeções virais, o que é essencial em casos graves e para evitar o uso desnecessário de antibióticos.⁶⁵ Atualmente, o diagnóstico de infeções virais é feito, essencialmente, pela deteção de componentes virais e de anticorpos antivirais. A pesquisa de componentes virais consiste na deteção de antígenos

virais através de imunoenaios, e na detecção do genoma viral através de técnicas de biologia molecular.⁴²

Os métodos de biologia molecular permitem a detecção do genoma viral através da extração e amplificação, utilizando a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real, um método rápido com elevada sensibilidade e especificidade. A amplificação e a detecção da sequência de DNA de interesse ocorrem em simultâneo, isto é possível através da associação de um termociclador e um fluorómetro. Quando ocorre amplificação de DNA, há emissão de fluorescência. No caso de se tratar de um vírus com RNA, utiliza-se, inicialmente, a enzima Transcriptase Reversa para obter uma cadeia de DNA complementar do segmento de RNA de interesse. em seguida realiza-se o método de PCR (RT-PCR).⁴²

No laboratório do HUC, a técnica de PCR em tempo real é realizada nos sistemas GeneXpert® e VitaPCR™ para a pesquisa de SARS-CoV-2, por exemplo. A técnica de PCR multiplex, realizada no sistema FilmArray® Torch, permite avaliar a presença de vários vírus em simultâneo, como Adenovírus, SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, entre outros.

8.6. Técnicas de biologia molecular

GeneXpert®

O sistema GeneXpert® baseia-se na técnica de PCR em tempo real. O aparelho realiza automaticamente a extração dos ácidos nucleicos, amplificação e detecção da sequência alvo. Este sistema é utilizado na pesquisa dos genes que codificam toxinas de *Clostridium difficile*, detecção do RNA do SARS-CoV-2, pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, detecção de genes que codificam carbapenemases, detecção e diferenciação de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina, pesquisa de *M.tuberculosis complex* e genes de resistência à rifampicina, entre outros.^{42,75}

VitaPCR™

O sistema VitaPCR™ utiliza a técnica RT-PCR para pesquisa do SARS-CoV-2. O teste é realizado a partir de amostras de zaragatoas nasofaríngeas ou orofaríngeas, e em apenas 20 minutos obtém-se o resultado. No VitaPCR™, a pesquisa é direcionada a 3 alvos: o gene da β -globina humana, o gene codificante da nucleocápside (comum aos vírus de tipo SARS), e o gene específico do SARS-CoV-2. O resultado do teste é considerado “Detetado” quando há amplificação dos 3 genes.⁷⁶

FilmArray® Torch

O sistema FilmArray® permite detetar, simultaneamente, sequências de ácidos nucleicos de múltiplos agentes patogénicos, através de PCR multiplex nested. Este aparelho permite a preparação da amostra, amplificação e detecção das sequências de ácidos nucleicos num sistema

fechado, reduzindo, assim, a contaminação cruzada entre amostras e produtos amplificados. O método de PCR nested engloba a realização de dois PCR. O primeiro PCR utiliza *primers* externos, e o segundo PCR utiliza *primers* internos. A amplificação é detetada através da fluorescência emitida pela sonda LCGreen®.^{42:77}

Este sistema utiliza painéis específicos para a pesquisa de agentes patogênicos. Cada painel permite a pesquisa de um grupo de microrganismos prováveis de causar a infecção, de acordo com a sintomatologia do paciente. Os painéis utilizados no sistema estão resumidos no Anexo IV.

8.7. Serologia

A serologia estuda as reações entre antígenos e anticorpos no soro, o que permite o diagnóstico de doenças infecciosas e avaliar o estado de imunidade do hospedeiro, através da determinação e quantificação de anticorpos.⁴⁷

A presença de um agente patogênico num indivíduo imunocompetente desencadeia uma resposta imune humoral, ou seja, ocorre a produção de anticorpos. Os primeiros anticorpos a surgirem são as imunoglobulinas M (IgM), e posteriormente surgem as imunoglobulinas G (IgG). Posto isto, a presença de IgM no soro sugerem uma infecção aguda ou recente, enquanto que a presença de IgG no soro indicam uma infecção passada ou imunização.⁴⁷

O estudo da cinética de anticorpos requer pelo menos 2 amostras de soro com um intervalo de 2 a 3 semanas. Desta forma, é possível monitorizar a produção de anticorpos e interpretar a evolução da doença.

8.7.1. Métodos de Serologia

A quantificação e a determinação do tipo de anticorpos é feita a partir de imunoensaios. De seguida, vou descrever os métodos utilizados no laboratório de serologia.

a) Imunoensaio por quimioluminescência (CLIA)

CLIA é baseado no princípio de quimioluminescência. A amostra de soro é incubada com as micropartículas magnéticas revestidas com antígenos recombinantes específicos, e os anticorpos presentes na amostra ligam-se aos antígenos. De seguida, adiciona-se o conjugado (anticorpo anti-imunoglobulina humana com isoluminol), que se liga aos anticorpos existentes no soro. Após a incubação, é adicionado o reagente para iniciar a reação de quimioluminescência, a qual resulta na emissão de luz. A medição do sinal luminoso é feita em unidades relativas de luz (RLU), que é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra.⁷⁸

Este método é utilizado no doseamento dos anticorpos anti-Parotidite (IgG e IgM).

b) Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

No método de ELISA, o antígeno específico encontra-se adsorvido na superfície da placa onde decorre a reação. Na presença de anticorpos na amostra, há formação de complexos antígeno-anticorpo. A deteção dos imunocomplexos é feita através de uma reação enzimática. A adição do anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com uma enzima e a adição do substrato resulta numa reação enzimática com formação de um produto colorido. A intensidade de cor medida, é proporcional à concentração de anticorpos da amostra.⁴²

Este método é utilizado para a determinação de anticorpos anti-*Leptospira* (IgG e IgM).

c) Ensaio de fluorescência enzimática (ELFA)

ELFA é um teste imunoenzimático, semelhante ao método de ELISA. A diferença resume-se à forma de deteção do complexo antígeno-anticorpo formado. O imunocomplexo é detetado através de uma reação de hidrólise que resulta num produto fluorescente. A reação ocorre após a adição do anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com fosfatase alcalina e a adição do substrato. A fluorescência emitida é medida a 450nm, sendo também proporcional à concentração de anticorpos presentes na amostra.⁷⁹

O método de ELFA é utilizado na determinação dos anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (IgG e IgM) e no teste de avididade da IgG.

d) Imunofluorescência indireta (IFI)

O método de imunofluorescência indireta utiliza uma lâmina que contém um antígeno específico, adsorvido na sua superfície. Os anticorpos presentes na amostra ligam-se ao antígeno, formando complexos antígeno-anticorpo. A adição de um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com fluoresceína permite detetar os imunocomplexos através da observação das lâminas com um microscópio de fluorescência. A intensidade de fluorescência observada é proporcional à concentração de anticorpos.⁴⁷

A pesquisa de anticorpos (IgG) anti-*Rickettsia conorii* e anti-*Coxiella burnetii* é realizada pelo método IFI.

e) Rosa de Bengala

Rosa de Bengala é um teste de *screening* rápido e sensível, baseado na reação de aglutinação. Este teste permite detetar a presença de anticorpos (IgM e IgG) específicos para *Brucella abortus* no soro e no LCR. O teste consiste na mistura da amostra do paciente com uma suspensão tamponada de *Brucella abortus* 99 inativada e corada de Rosa de Bengala. Se ocorrer aglutinação, é considerado positivo, e deve ser feito o Teste de Wright.

f) Reação de Wright

A reação de Wright apenas é executada após um teste Rosa de Bengala positivo. Este teste é semi-quantitativo, pois permite quantificar o título de anticorpo na amostra. A reação de Wright baseia-se na reação de aglutinação entre a amostra e uma suspensão tamponada de *Brucella abortus* inativada. A partir de diluições sucessivas da amostra, é possível definir o título de anticorpo presente na amostra. O resultado é considerado positivo com um título igual ou superior a 1:80.

g) Rapid Plasma Reagin (RPR)

O RPR é um teste semi-quantitativo baseado na reação de aglutinação, o que permite a detecção de reaginas. As reaginas são anticorpos sintetizados quando o organismo está em contacto com o *Treponema pallidum*. A realização do teste consiste na mistura da amostra com o reagente (cardiolipina-lectina-colesterol) que atua como antigénio. A aglutinação indica um resultado positivo.

O RPR é um teste não treponémico, por isso é sempre necessário confirmar o resultado por um teste treponémico. Os pacientes diagnosticados com sífilis são monitorizados através destes testes não treponémicos para avaliar a evolução da doença.⁴⁷

h) Treponema Passive Particle Agglutination (TP-PA)

O TP-PA é baseado na reação de aglutinação com diluições sucessivas em poços. Cada poço contém uma suspensão de partículas de gelatina sensibilizadas com o antigénio de *Treponema pallidum*. As amostras são adicionadas aos poços e após a incubação verifica-se as reações de aglutinação. Os anticorpos anti-*Treponema pallidum* presentes na amostra ligam-se ao antigénio e forma-se aglutinação.

9. Casos Clínicos

Caso clínico I

Doente do género feminino, com 68 anos transferida de outro hospital, por suspeita de hepatite tóxica por ingestão de cogumelos. À entrada do HUC apresentava um quadro de náuseas, vômitos, dejeções diarreicas aquosas muito frequentes associadas a cólica abdominal, e sem febre.

As análises realizadas estão apresentadas no Anexo V, Tabela IX.

Os valores elevados de AST e ALT sugerem a ocorrência de lesão hepatocelular. A lactato desidrogenase (LDH) encontra-se elevada, o que é indicativo de lesão celular. A hiperbilirrubinémia também se deve à lesão hepatocelular, devido à perda da capacidade hepática da biotransformação da bilirrubina.

A alteração das provas de coagulação pode estar associada à falha da síntese hepática. O fígado é responsável pela síntese de fatores de coagulação, e por isso, na presença de falha hepática, verifica-se uma diminuição dos fatores de coagulação (fator I, II, V, VII e X) e consequentemente um aumento do tempo de protrombina. A perda da capacidade de síntese hepática também se verifica pela diminuição das proteínas totais e pelo valor de albumina próximo do limite inferior do intervalo de referência.

A diminuição da albumina é mais acentuada em situações de doenças hepáticas crónicas. Neste caso, como é uma lesão hepática aguda, a albumina apresenta um valor dentro do intervalo de referência, contudo com uma ligeira diminuição. A diminuição das proteínas totais pode confirmar a origem hepática da alteração das provas de coagulação. Desta forma, a diminuição das proteínas totais e o aumento do tempo de protrombina é sugestivo da perda da capacidade da síntese hepática.

A análise bioquímica é concordante com o diagnóstico de hepatite tóxica associada a uma coagulopatia resultante da perda da síntese hepática.

As análises serológicas realizadas estão apresentadas no Anexo V, Tabela X. O estudo serológico da hepatite B (HB), hepatite C (HC) e da infeção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) permite excluir o diagnóstico de hepatite viral.

O estudo serológico da hepatite B consiste na determinação dos anticorpos **Anti-HBc** (anticorpos totais (IgM e IgG) para o antígeno do core do vírus da HB) e **Anti-HBs** (anticorpo para o antígeno de superfície do vírus da HB). Também se realiza a determinação do **antígeno HBs** (antígeno de superfície do vírus da HB). Os resultados obtidos do estudo serológico da HB concluíram que apenas o anticorpo Anti-HBs obteve o resultado “reativo”, o que é compatível com uma imunização por vacina.

O teste de *screening* para hepatite C consiste na determinação dos anticorpos totais **Anti-HCV** (IgM e IgG), para o qual se obteve um resultado “não reativo”.

O rastreio laboratorial da infecção por HIV consiste na determinação do **antigénio p24** e dos anticorpos totais **Anti-HIV** (IgM e IgG). Em ambos os testes o resultado obtido foi “não reativo”, o que confirma que não há infecção por HIV.

Desta forma, conclui-se que o quadro clínico apresentado pela paciente não resulta de uma hepatite viral provocada pela infecção do vírus da HB, vírus da HC ou HIV.

Além disso, foi realizada a análise microbiológica pela pesquisa rápida de microrganismos através do painel gastrointestinal no sistema FilmArray® Torch. Os resultados obtidos foram negativos para todos os microrganismos (Anexo V, Tabela XI).

O diagnóstico definitivo foi uma hepatite tóxica por uma toxina do cogumelo, com insuficiência hepática aguda e coagulopatia.

Caso clínico 2

Doente do género feminino, com 65 anos recorre ao serviço de urgência do HUC por apresentar dispneia, cansaço e febre. Durante o internamento, sofreu uma convulsão, o que levou à suspeita de meningite.

Procedeu-se à colheita de LCR por punção lombar, para o diagnóstico laboratorial de meningite, o que engloba análise microbiológica, análise bioquímica e análise citológica.

Na análise bioquímica, o LCR apresentou um aumento de proteínas, devido ao metabolismo bacteriano, e uma diminuição da concentração de glicose, que está associada ao aumento do consumo de glicose por parte das bactérias. Na análise citológica foi detetado o predomínio de células polimorfonucleares, o que está associado a infeções por bactérias (Anexo VI, Tabela XII). Estes resultados são compatíveis com uma meningite bacteriana.

A amostra de LCR foi separada em dois tubos. Um tubo para realizar a pesquisa do agente patogénico utilizando o painel do sistema FilmArray® Torch mais adequado à sintomatologia, neste caso o painel meningite/encefalite. E o outro tubo para a inoculação das primoculturas e observação microscópica.

Numa emergência médica, utilizam-se técnicas de biologia molecular para acelerar o processo laboratorial e confirmar o diagnóstico. Desta forma, realizou-se a pesquisa de microrganismos prováveis de causar meningites e/ou encefalites através do painel meningite/encefalite do sistema FilmArray® Torch. Este sistema detetou a presença de *Listeria monocytogenes* no LCR (Anexo VI, Tabela XIII).

A amostra de LCR foi inoculada nos meios GS e PVX para pesquisa e isolamento do agente patogénico, e também foi realizado um esfregaço em lâmina para coloração de Gram. As

primoculturas foram incubadas a 37°C durante cerca de 48h. A observação microscópica da lâmina, representada na Figura 5, revelou a presença de bacilos Gram positivo, sugestivos de *Listeria monocytogenes*. Após o período de incubação, observaram-se as colónias pequenas, lisas e branco-acinzentadas, como demonstrado na Figura 6*.

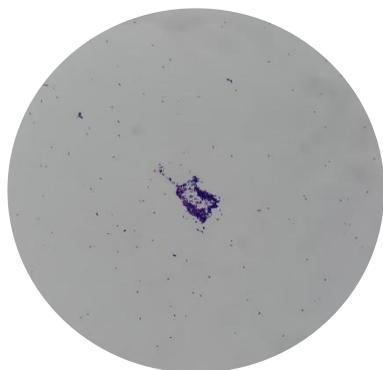


Figura 5: Exame microscópico do LCR. Observaram-se bacilos Gram positivo, sugestivos de *Listeria monocytogenes*.



Figura 6: Crescimento bacteriano em cultura de GS.

Após a identificação da bactéria, realizou-se o antibiograma manual para *Listeria monocytogenes*, utilizando o meio MH-F, de acordo com as recomendações das normas descritas no EUCAST. Na Figura 7 são apresentados os antibiogramas realizados.



Figura 7: Antibiograma em disco para *Listeria monocytogenes*.

Os resultados do antibiograma concluíram que a bactéria apresenta sensibilidade para ampicilina, eritromicina, penicilina, trimetoprim /sulfametoxazol e meropeneno.

Inicialmente, a terapêutica empírica administrada foi ceftriaxone e ampicilina. Após a identificação e realização do TSA, a terapêutica foi ajustada, mantendo apenas a ampicilina, uma vez que a *Listeria monocytogenes* é intrinsecamente resistente ao ceftriaxone.

10. Conclusão

A realização do estágio foi uma experiência muito enriquecedora, tanto a nível profissional como pessoal. Estagiar no CHUC deu-me a oportunidade de conhecer a realidade de um laboratório clínico num hospital de referência, e de trabalhar com uma equipa multidisciplinar, que me transmitiu todos os conhecimentos possíveis. Este estágio possibilitou-me consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas, e aplicá-los na prática laboratorial.

Referências

1. Littlewood, J. M. - Sweat tests to diagnose cystic fibrosis in adults. *Br Med J (Clin Res Ed)* **287**, 501–501 (1983).
2. Burtis, C. A. & Bruns, D. E. - *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics*. (Elsevier Health Sciences, 2016).
3. Cuartero, M., Parrilla, M. & Crespo, G. A. - Wearable Potentiometric Sensors for Medical Applications. *Sensors (Basel)*. **19**, (2019).
4. Iranifam, M. - Analytical applications of chemiluminescence-detection systems assisted by magnetic microparticles and nanoparticles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **51**, 51–70 (2013).
5. Kricka, L. J. - Clinical applications of chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* **500**, 279–286 (2003).
6. Lopez-Giacoman, S. & Madero, M. - Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J. Nephrol.* **4**, 57 (2015).
7. Traynor, J., Mactier, R., Geddes, C. C. & Fox, J. G. - How to measure renal function in clinical practice. *Br. Med. J.* **333**, 733–737 (2006).
8. Shahbaz, H. & Gupta, M. - Creatinine Clearance. (2021).
9. Lamb, E. J., O’Riordan, S. E. & Delaney, M. P. - Kidney function in older people: pathology, assessment and management. *Clin. Chim. Acta* **334**, 25–40 (2003).
10. Liver function tests - Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/liver-function-tests/about/pac-20394595>.
11. Price, C. P., Newall, R. G. & Boyd, J. C. - Use of Protein:Creatinine Ratio Measurements on Random Urine Samples for Prediction of Significant Proteinuria: A Systematic Review. *Clin. Chem.* **51**, 1577–1586 (2005).
12. Neligan, P. J. - Fluid and electrolyte balance. *Anaesth. Intensive Care Med.* **22**, 169–173 (2021).
13. Shrimanker, I. & Bhattarai, S. - Electrolytes. *Princ. Nutr. Nutr. Fundam. Individ. Nutr.* 309–315 (2021).
14. Theis, S. R. & Khandhar, P. B. - Pseudohyponatremia. *StatPearls* (2021).
15. Rifai, N., Horvath, A. R. & Wittwer, C. T. - *Tietz Textbook of CLINICAL CHEMISTRY and MOLECULAR DIAGNOSTICS*. (Elsevier, 2018).
16. Trepiccione, F., Capasso, G. & Unwin, R. - Electrolytes and acid–base: common fluid and electrolyte disorders. *Medicine (Baltimore)*. **47**, 489–497 (2019).
17. Thanippuli Arachchige, D. & McClure, J. - Electrolyte disorders in the critically ill. *Anaesth. Intensive Care Med.* **21**, 147–153 (2020).

18. Alcalose metabólica - Distúrbios endócrinos e metabólicos - Manuais MSD edição para profissionais. [https://www.msmanuals.com/pt-pt/professional/distúrbios-endócrinos-e-metabólicos/regulação-e-distúrbios-ácido-base/alcalose-metabólica?query=Alcalose](https://www.msmanuals.com/pt-pt/professional/disturbios-endocrinos-e-metabolicos/regulacao-e-disturbios-acido-base/alcalose-metabolica?query=Alcalose).
19. Ebonwu, E. O., Nagel, S. E., Repsold, L. & Pillay, T. S. - Critical evaluation of equations for serum osmolality: Proposals for effective clinical utility. *Clin. Chim. Acta* **510**, 79–87 (2020).
20. Giannini, E., Testa, R. & Savarino, V. - Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association* vol. 388 539–547 (2005).
21. Collier, J. - *Clinical and biochemical assessment of symptomatic and asymptomatic liver disease*. (2019).
22. Levick, C. - How to interpret liver function tests. *South Sudan Med. J.* **10**, 40–43 (2017).
23. Liver Function Tests for Chronic Liver Disease | Stanford Health Care. <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/liver-kidneys-and-urinary-system/chronic-liver-disease/diagnosis/liver-function-tests.html>.
24. Khan, R. S., Houlihan, D. D. & Newsome, P. N. - Investigation of jaundice. *Med. (United Kingdom)* **47**, 713–717 (2019).
25. Guerra Ruiz, A. R. et al. - Measurement and clinical usefulness of bilirubin in liver disease. *Adv. Lab. Med. / Av. en Med. Lab.* **2**, 352–361 (2021).
26. Gounden, V., Vashisht, R. & Jialal, I. - Hypoalbuminemia. *StatPearls* (2021).
27. Mach, F. et al. - 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* **41**, 111–188 (2020).
28. Binder, C. J. et al. - The year 2020 in Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **326**, 35–44 (2021).
29. Rato, Q., Carvalho, M. & Gomes, E. M. - *Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Dislipidemias no Adulto. Norma da Direção-Geral da Saúde* (Direção-Geral da Saúde, 2015).
30. Soria-Florado, M. T., Schröder, H., Grau, M., Fitó, M. & Lassale, C. - High density lipoprotein functionality and cardiovascular events and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* **302**, 36–42 (2020).
31. Borén, J. et al. - Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: Pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **41**, 2313–2330 (2020).
32. Mccullough, P. A. - Cardiac Learning guide series DIAGNOSTICS LEARNING GUIDE: CARDIAC .
33. Reyes-Retana, J. A. & Duque-Ossa, L. C. - Acute Myocardial Infarction Biosensor: A Review From Bottom Up. *Curr. Probl. Cardiol.* **46**, 100739 (2021).

34. Aldous, S. J. - Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **164**, 282–294 (2013).
35. Tang, W. H. W. et al. - National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Utilization of Cardiac Biomarker Testing in Heart Failure. *Clin. Biochem.* **41**, 210–221 (2008).
36. Thygesen, K. et al. - Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur. Heart J.* **40**, 237–269 (2019).
37. Ming-qing, T., Xu-hua, M. A. O., Yi-xin-yue, G., Lin-sen, Q. & Jing, X. I. E. - Research Progress of C-reactive Protein Analysis. *Chinese J. Anal. Chem.* **48**, 1121–1130 (2020).
38. Labib, M. H. - Hypoglycaemia. in *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects: Third Edition* 333–348 (Churchill Livingstone, 2014). doi:10.1016/B978-0-7020-5140-1.00017-1.
39. Direção Geral da Saúde. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. *Norma da Direção Geral da Saúde* 1–13 (2011).
40. Bartoli, E., Fra, G. P. & Schianca, G. P. C. - The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur. J. Intern. Med.* **22**, 8–12 (2011).
41. Arouj, M. Al et al. - Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* vol. 93 (2011).
42. Tille, P. M. - *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. (2017).
43. Fonseca, A. et al. - Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. *Inst. Nac. Saúde, Dr. Ricardo Jorge* 1–193 (2004).
44. Cappuccino, J. G. & Welsh, C. - *Microbiology - A Laboratory Manual*. (2018).
45. Jorgensen, J. H. & Pfaller, M. A. - *Manual of Clinical Microbiology*. (2015).
46. Fallon, D. et al. - A comparison of the performance of cystine lactose electrolyte deficient (CLED) agar with Oxoid chromogenic urinary tract infection (CUTI) medium for the isolation and presumptive identification of organisms from urine. *J. Clin. Pathol.* **55**, 524 (2002).
47. Levinson, W. - *Microbiologia Médica e Imunologia*. (2011).
48. Hunt, R. - Bacteriology. in *Microbiology and Immunology On-line* (2016).
49. Pasternak, J. - New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Inst. Isr. Ensino e Pesqui. Albert Einstein* (2012).
50. Oviaño, M. & Rodríguez-Sánchez, B. - MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* **39**, 192–200 (2021).
51. Hou, T. Y., Chiang-Ni, C. & Teng, S. H. - Current status of MALDI-TOF mass

- spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug Anal.* **27**, 404–414 (2019).
52. Cosgrove, S. E., Avdic, E., Dzintars, K. & Smith, J. - *Antibiotic Guidelines 2015-2016*. (2015).
 53. Burns, J. L. *et al.* - Comparison of two commercial systems (Vitek and MicroScan-WalkAway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **39**, 257–260 (2001).
 54. Matuschek, E., Brown, D. F. J. & Kahlmeter, G. - Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. doi:10.1111/1469-0691.12373.
 55. Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S. & Mietzner, T. - *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. (2013).
 56. Previtali, G., Ravasio, R., Seghezzi, M., Buoro, S. & Alessio, M. G. - Performance evaluation of the new fully automated urine particle analyser UF-5000 compared to the reference method of the Fuchs-Rosenthal chamber. *Clin. Chim. Acta* **472**, 123–130 (2017).
 57. Giesen, C. D. *et al.* - Performance of flow cytometry to screen urine for bacteria and white blood cells prior to urine culture. *Clin. Biochem.* **46**, 810–813 (2013).
 58. De Rosa, R., Grosso, S., Lorenzi, G., Bruschetta, G. & Camporese, A. - Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clin. Chim. Acta* **484**, 171–178 (2018).
 59. Camposampiero, D. *et al.* - Evaluation of the HB&L system for the microbiological screening of storage medium for organ-cultured corneas. *J. Ophthalmol.* **2013**, (2013).
 60. Fontana, C. *et al.* - A novel culturing system for fluid samples. *Med. Sci. Monit.* (2009) doi:10.12659/MSM.934854.
 61. Marschal, M. *et al.* - Evaluation of the accelerate pheno system for fast identification and antimicrobial susceptibility testing from positive blood cultures in bloodstream infections caused by gram-negative pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2116–2126 (2017).
 62. MYCOPLASMA, Simple and complete diagnosis of urogenital mycoplasmas | bioMérieux Diagnostics. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/mycoplasma-ist2>.
 63. Meningitis and Encephalitis Information Page | National Institute of Neurological Disorders and Stroke. <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Meningitis-and-Encephalitis-Information-Page#disorders-r1>.
 64. Castillo, D. *et al.* - *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae*. (WHO manual,

- 2011).
65. McPherson, R. A. & Pincus, M. R. - *Henry's Clinical diagnosis and Management by Laboratory Methods*. (2011).
 66. Tuberculosis (TB) | CDC. <https://www.cdc.gov/tb/>.
 67. Rivera, A. B., Tupasi, T. E., Grimaldo, E. R., Cardano, R. C. & Co, V. M. - Rapid and improved recovery rate of Mycobacterium tuberculosis in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Löwenstein Jensen medium. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* vol. 1 454–459 (1997).
 68. Pfyffer, G. E. et al. - Comparison of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 364–368 (1997).
 69. Subramanyam, B., Sivaramakrishnan, G. N., Dusthacker, A., Nagamiah, S. & Kumar, V. - Phage lysin as a substitute for antibiotics to detect Mycobacterium tuberculosis from sputum samples with the BACTEC MGIT 960 system. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 497–501 (2012).
 70. Durmaz, G. et al. - Optimum detection times for bacteria and yeast species with the BACTEC 9120 aerobic blood culture system: Evaluation for a 5-year period in a Turkish University Hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 819–821 (2003).
 71. Waite, R. T. & Woods, G. L. - Evaluation of BACTEC-MYCO/F lytic medium for recovery of mycobacteria and fungi from blood. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1176–1179 (1998).
 72. Haraus, E. et al. - Comparison of MGIT and Myco/F lytic liquid-based blood culture systems for recovery of Mycobacterium tuberculosis from pleural fluid. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1391–1394 (2015).
 73. Paniker, C. J. - *Textbook of MEDICAL PARASITOLOGY*. (Jaypee Brothers, 2007).
 74. Assafa, D. et al. - *Medical Parasitology*. (2004).
 75. Raja, R., Sreeramulu, P. N., Dave, P. & Srinivasan, D. - GeneXpert assay – A cutting-edge tool for rapid tissue diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.* **21**, 100204 (2020).
 76. Fournier, P. E. et al. - Contribution of VitaPCR SARS-CoV-2 to the emergency diagnosis of COVID-19. *J. Clin. Virol.* **133**, 104682 (2020).
 77. Blaschke, A. J. et al. - Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**, 349–355 (2012).
 78. Cinquanta, L., Fontana, D. E. & Bizzaro, N. - Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto-Immunity Highlights* **8**,

(2017).

79. GHARAVI, M. J., JALALI, S., KHADEM VATAN, S. & HEYDARI, S. - Detection of IgM and IgG anti-Toxoplasma antibodies in renal transplant recipients using ELFA, ELISA and ISAGA methods: comparison of pre- and post-transplantation status. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **105**, 367 (2011).

ANEXOS

Anexo I – Metodologias utilizadas no setor de Imunologia e respectivos exemplos.

Metodologia utilizada	Exemplos de parâmetros pesquisados/doseados
Imunofluorescência indireta (IFI)	Anticorpos antinucleares e citoplasmáticos (ANA); Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilo (ANCA's) Anticorpos Anti-dsDNA; Anticorpos Anti-Supra-Renal.
Radioimunoensaio (RIA)	Anticorpos Anti-dsDNA; Anticorpos Anti-insulina.
Imunoensaio quimioluminescente	Anti-antígenos nucleares ENA7: SSA (Ro60, Ro52), SSB, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1; Anticorpos Anti-DFS70; Anticorpos Anti-membrana basal glomerular (GBM).
ELISA	Anticorpos anti-fator intrínseco; Anti-cardiolipina; Anti β 2- glicoproteína; Anti-histonas; Anti-TNF α ; Elastase.
<i>Immunoblotting</i>	Anticorpos para estudo da função hepática (Anti-Gp210; Anti-Sp100); Anticorpos IgG dirigidos a antígenos neuronais; Anticorpos para estudo de miosite; Anticorpos Anti-membrana basal glomerular (GBM).
Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)	Triptase; IgE específica e IgG específica para alérgenos; Anti-Transglutaminase (IgA e IgG); Anti-Gliadina (IgA e IgG); Anticorpos Anti-Mieloperoxidase (MPO); Anticorpos Anti-Proteinase 3 (PR3); Anticorpos Anti-dsDNA.
Nefelometria	Fator reumatoide; Subclasses IgG; Subclasses IgA; IgD; IgG em LCR; Cisteína; C1 q; C1 i; Pré-albumina; Albumina; Crioglobulinas; Cadeias leves na urina; β 2-globulina na urina.
Turbidimetria	IgG; IgM; IgA; Cadeias leves kappa; Cadeias leves lambda; C3; C4; CH50.
Imunodifusão radial	C2; C5.

Anexo II – Exemplos de equipamentos utilizados no laboratório de Bioquímica do CHUC e respetivas metodologias e parâmetros.

Equipamento	Método	Parâmetros
Alinity c	Espetrofotometria	Azoto ureico; Creatinina; Ácido úrico; Albumina; Glicose; Bilirrubina; Amónia; AST; ALT; GGT; ALP; Amilase; Colinesteras; Colesterol; Triglicéridos; LDL; HDL; CK; CM-MB; Proteína total; Cálcio; Magnésio; LDH; Lactato.
	Turbidimetria	Microalbuminúria; Proteinúria; Lp(a); ApoA I; ApoB; PCR; Transferrina; α -1-antitripsina; β -2-microglobulina.
	Potenciometria	Ionograma (Na^+ , K^+ , Cl^-).
Alinity i	Imunoensaios quimioluminescentes	Mioglobina; BNP; NT-pro BNP; hsTnl; Procalcitonina; Vitamina B12; Homocisteína; Análises serológicas; Fármacos imunossupressores.
Liaison		Vitamina D; Renina; Aldosterona; Análises serológicas.
AutionMax	Técnicas fotométricas	Sumária de urina.
SediMax	Observação automática ao microscópio	Sedimento urinário.
Analyst 800	Espetrofotometria absorção atómica	Lítio; Cobre; Zinco; Alumínio.
SetiFit	Teste imunoquímico que identifica a hemoglobina humana	Deteção sangue oculto nas fezes.
Osmómetro	Medição osmolalidade por crioscopia através do ponto de congelação	Osmolalidade.
Rapid Point 500	Gasometria de sangue arterial	pH; pCO_2 ; pO_2 ; sO_2 ; HCO_3^- ; Na^+ ; K^+ ; Ca^{2+} ; Cl^- ; Glucose; Lactato; Hemoglobina.
Variant II DI00	HPLC	Hemoglobina glicada.
Minicap Sebia	Eletroforese capilar de Hb glicada	Pesquisa de variantes de hemoglobina (HbA, HbA ₂ , HbS, HbF).

Anexo III

Tabela VII: Características das diferentes lipoproteínas.

Lipoproteína	Densidade (g/mL)	Principal Componente	Principal Apolipoproteína	Diâmetro (nm)
Quilomicron	<0,95	Triglicéridos	ApoB48	80 – 100
VLDL	0,95 - 1,006	Triglicéridos	ApoB100	30 – 80
IDL	1,006 - 1,019	Triglicéridos e Colesterol	ApoB100	25 – 30
LDL	1,019 - 1,063	Colesterol	ApoB100	20 – 25
HDL	1,063 - 1,210	Proteínas	ApoA1	5 – 13

Tabela VIII: Painéis de antibióticos utilizados no MicroScan WalkAway (TSA automático), de acordo com os microrganismos.

Painéis de antibióticos	Microrganismos
EN52	Bactérias GN
SAT36	<i>Staphylococcus</i> e géneros relacionados
E37	<i>Streptococcaceae</i>
NF50	Bactérias GN não fermentadoras

Anexo IV – Painéis utilizados no FilmArray de acordo com os microrganismos.

Painel FilmArray	Microrganismos
Painel Respiratório	Adenovírus; Coronavirus HKU1; Coronavirus NL63; Coronavirus 229E; Coronavirus OC43; SARS-CoV-2; Rinovírus humano; Enterovírus; Influenza A; Influenza A / H1; Influenza A / H3; Influenza A / H1-2009; Influenza B; Vírus da Parainfluenza 1; Vírus da Parainfluenza 2; Vírus da Parainfluenza 3; Vírus da Parainfluenza 4; Vírus Sincicial Respiratório; <i>Bordetella pertussis</i> ; <i>Chlamydia pneumoniae</i> ; <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
Painel Gastrointestinal	Adenovírus F 40/41; Astrovírus; Norovírus; Rotavírus A; Sapovírus (I, II, IV e V); <i>Campylobacter</i> spp.; <i>Clostridium difficile</i> (toxina A / B); <i>Plesiomonas shigelloides</i> ; <i>Salmonella</i> ; <i>Yersinia enterocolitica</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> ; <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC); <i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC); <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC); <i>E. coli</i> produtora de toxina semelhante a Shiga (STEC); <i>E. coli</i> O157; <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC); <i>Shigella</i> ; <i>Cryptosporidium</i> ; <i>Cyclospora cayetanensis</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Giardia lamblia</i> .
Painel Meningite/encefalite	Citomegalovírus (CMV); Enterovírus (EV); Vírus Herpes simplex 1; Vírus Herpes simplex 2; Herpesvírus humano 6; Parecovírus humano (HPeV); Vírus varicela-zoster; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Haemophilus influenzae</i> ; <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Neisseria meningitidis</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> .
Painel Hematológico	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Haemophilus influenzae</i> ; <i>Neisseria meningitidis</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i> ; <i>S. pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> ; complexo <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> ; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Enterobacter</i> spp.; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> , <i>Candida</i> spp.; <i>C. albicans</i> .

Anexo V – Caso clínico I

Tabela IX: Análises efetuadas na admissão hospitalar.

Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Hemoglobina	13,6	11,8 – 15,8 g/dL
VGM	86,2	80 – 100 fL
HCM	29,4	27 – 34 pg
Ht (hematócrito)	39,9	37 – 49 %
Leucócitos	10,5	3,6 – 10,5 x 10 ⁹ /L
Plaquetas	258	140 – 385 x10 ⁹ /L
Tempo de protrombina	17,1	9,4 – 12,5 segundos
Glicose	193	60 – 109 mg/dL
Azoto ureico	12	7,9 – 20,9 mg/dL
Creatinina	0,69	0,72 – 1,18 mg/dL
Na ⁺	136	136 – 146 mmol/L
K ⁺	3,9	3,5 – 5,1 mmol/L
Cl ⁻	111	101 – 109 mmol/L
Proteínas totais	5,7	6,6 – 8,3 g/dL
Albumina	3,6	3,5 – 5,2 g/dL
LDH	562	<248 U/L
AST	405	<45 U/L
ALT	416	<35 U/L
FA	74	30 – 120 U/L
GGT	16	<55 U/L
Bilirrubina total	2,4	0,2 – 1,2 mg/dL
Bilirrubina direta	1,2	<0,5 mg/dL
CK	45	<171 U/L
PCR	0,05	<0,5 mg/dL

Tabela X: Análises serológicas.

	Parâmetros	Resultado
Hepatite B	Ag HBs	Não reativo
	Ac HBc	Não reativo
	Ac HBs	534 mUI/mL
Hepatite C	Ac anti-HCV (IgG/IgM)	Não reativo
HIV	Ag/Ac	Não reativo

Tabela XI: Resultados obtidos por FilmArray (Painel Gastrointestinal)

Microrganismo	Resultado
<i>Campylobacter</i> spp.	Não detetado
<i>Clostridium difficile</i> , toxina A/B	Não detetado
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Não detetado
<i>Salmonella</i>	Não detetado
<i>Vibrio</i>	Não detetado
<i>Vibrio cholerae</i>	Não detetado
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Não detetado
EAEC	Não detetado
EPEC	Não detetado
ETEC	Não detetado
EIEC	Não detetado
<i>Cryptosporidium</i>	Não detetado
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Não detetado
<i>Entamoeba histolytica</i>	Não detetado
<i>Giardia lamblia</i>	Não detetado
Adenovirus F 40/41	Não detetado
Astrovirus	Não detetado
Norovirus GI/GII	Não detetado
Rotavirus A	Não detetado
Sapovirus	Não detetado

Anexo VI – Caso clínico 2**Tabela XII:** Análises bioquímicas e citológicas do LCR.

	Parâmetros	Resultado	Valores de referência
Bioquímica	Proteínas	628	15 – 40 mg/dL
	Glicose	< 5	40 – 70 mg/dL
Citologia	Leucócitos	143	< 3 /mm ³
	Eritrócitos	Incontáveis	
	Predomínio	Polimorfonucleares	

Tabela XIII: Resultados obtidos por FilmArray (Painel meningite/encefalite)

Microrganismo	Resultado
Vírus Herpes Simplex 1 (HSV1)	Não detetado
Vírus Herpes Simplex 2 (HSV2)	Não detetado
Enterovírus	Não detetado
Virus Varicela zoster (VZV)	Não detetado
Virus Herpes Humano 6 (HHV-6)	Não detetado
Parechovirus Humano (HPeV)	Não detetado
Citomegalovirus (CMV)	Não detetado
<i>Neisseria meningitidis</i>	Não detetado
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não detetado
<i>Hemophilus influenza</i>	Não detetado
<i>Escherichia coli</i> K1	Não detetado
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Não detetado
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detetado
<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	Não detetado