



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Fernandes Gaspar

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular efetuado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pela Dra. Alice Augusta Lopes Mendes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Inês Fernandes Gaspar

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular efetuado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e pela Dra. Alice Augusta Lopes Mendes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao Doutor Fernando Rodrigues, diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC), pela oportunidade de realizar o meu estágio neste serviço e de aplicar e desenvolver os conhecimentos obtidos durante o Mestrado de Análises Clínicas.

Agradeço à Professora Doutora Ana Miguel Matos, minha orientadora interna, pela amabilidade, ajuda, orientação, disponibilidade e motivação ao longo do estágio, mas também durante a realização do presente relatório.

Agradeço às minhas orientadoras externas, Dra. Alice Mendes e Doutora Cristiana Canha, por todo o apoio, disponibilidade, orientação e conhecimento transmitido durante todo o período de estágio.

Na impossibilidade de referir todos os profissionais que contribuíram para a minha formação e me auxiliaram nos diversos setores, agradeço a toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica.

Agradeço à minha colega de mestrado e estágio, Viviana Pedra, pelo companheirismo e apoio durante estes 6 meses de estágio.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais e avós pelo apoio, ajuda e carinho sempre que necessário. Sem eles não teria sido possível chegar até aqui.

Índice

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iii
1. Introdução.....	1
2. Caracterização do Laboratório.....	1
3. Controlo de Qualidade.....	2
4. Setor de Hematologia.....	4
5. Setor de Microbiologia.....	5
5.1. Bacteriologia.....	6
5.2. Micobacteriologia.....	21
5.3. Parasitologia.....	24
5.4. Micologia.....	25
5.5. Serologia.....	27
6. Setor de Imunologia.....	30
7. Setor de Bioquímica Clínica.....	32
7.1. Aparelhos e suas metodologias.....	32
7.2. Parâmetros bioquímicos.....	33
8. Caso clínico.....	50
9. Conclusão.....	53
10. Bibliografia.....	54

Índice de Figuras

Figura 1 - Formas e agrupamentos bacterianos.....	6
Figura 2 - A- Sementeira semi-quantitativa. B- Sementeira por técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície de um meio sólido. C- Sementeira em toalha.....	10
Figura 3 - A- TSA realizado com o método de difusão em disco. B- TSA realizado com o método de tiras E-test.....	14
Figura 4 - Estrutura em corda do CMBT observada na coloração de Kinyoun a partir de meio MGIT.....	23
Figura 5 - TP-PA.....	29
Figura 6 - Crescimento bacteriano em meio Gs	51

Índice de Tabelas

Tabela I - Equipamentos da hemóstase e a sua função.....	5
Tabela II - Meios de cultura utilizados no laboratório de Bacteriologia do HUC.....	8
Tabela III - Caldos de enriquecimento utilizados no laboratório de Bacteriologia.....	11
Tabela IV - Avaliação do crescimento de microrganismos em uroculturas.....	15
Tabela V - Metodologias e exemplos de parâmetros avaliados em Autoimunidade.....	31
Tabela VI - Metodologias e exemplos de parâmetros avaliados em Imunoalergologia.....	31
Tabela VII - Exemplos de análises realizadas nos Alinity e respetivas metodologias.....	33
Tabela VIII - Parâmetros analisados na sumária de urina e respetivo significado clínico.....	40
Tabela IX - Elementos observados no sedimento urinário e respetivo significado clínico.....	41
Tabela X - Análises realizadas no HUC.....	51

Abreviaturas

AB- Aspirado brônquico	CNA- Gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro
ADH- Hormona anti-diurética	CV%- Coeficiente de Variação
ALT- Alanina aminotransferase	EAM- Enfarte agudo do miocárdio
AMA- Anticorpos anti-mitocôndria	ELFA- Ensaio de fluorescência enzimática
ANA- Anticorpos antinucleares e citoplasmáticos	ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática
ANCA- Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos	ENA7- Anticorpos anti-antígenos nucleares extraídos
APTT- Tempo de tromboplastina parcialmente ativado	ET%- Erro Total
AST- Aspartato aminotransferase	EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
BAAR- Bacilos ácido-álcool resistentes	FA- Fosfatase Alcalina
BCSA- Gelose seletiva para <i>Burkholderia cepacia</i>	FEIA- Imunoensaio fluoroenzimático
BHI- Brain Heart Infusion	FISH- Hibridização Fluorescente in Situ
Bias%- Inexatidão	G6PD- Glicose-6-fosfato desidrogenase
BNP- Péptido natriurético tipo B	GGT- Gama-glutamyltransferase
CAM- Gelose Campyloset	GN- Gram negativas
CBGN- Caldo de bacilos Gram negativos	GP- Gram positivas
CEQ- Controlo Externo da Qualidade	Gs- Gelose de sangue
CHUC- Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra	Hae2- Meio para <i>Haemophylus spp.</i>
CIN- Gelose <i>Yersinia</i>	HbA1c- Hemoglobina glicada
CIQ- Controlo Interno da Qualidade	HDL- Lipoproteína de alta densidade
CK- Creatina cinase	HEKT- Gelose Hektoen
CLED- Cistina, Lactose e Deficiente em eletrólitos	HG- Hospital Geral
CM- Caldo Cooked Meat	HIV- Vírus da imunodeficiência humana
CMBT- Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	HP- Hospital Pediátrico
CMI- Concentração mínima inibitória	hscTnl- Troponina I cardíaca de alta sensibilidade
CMIA- Imunoensaios por quimioluminescência com micropartículas	HUC- Hospital Universitário de Coimbra
	IFI- Imunofluorescência indireta
	IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INSA- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
 ISTs- Infecções sexualmente transmissíveis
 Ig- Imunoglobulina
 ITL- Inibidor tipo lúpus
 ITU- Infecção do trato urinário
 K₃-EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássio
 KV- Kanamicina e Vancomicina
 LBA- Lavado broncoalveolar
 LCR- Líquido cefalorraquidiano
 LDH- Lactato desidrogenase
 LDL- Lipoproteína de baixa densidade
 LJ- Löwenstein-Jensen
 MALDI-TOF- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
 MBPL- Manual de Boas Práticas Laboratoriais
 MGIT- Indicador de crescimento de micobactérias
 MHE- Gelose Mueller-Hinton
 MHF- Mueller-Hinton + 5% Sangue de cavalo + 20mg/l β-NAD*
 NALC- N-acetil-L-cisteína
 NE- Não esporuladores
 NT-pro-BNP- porção N-terminal do pro-BNP
 PANTA- polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina
 PCR- Proteína C reativa
 PT- Tempo de protrombina
 PVX- PolyViteX
 RPR- Rapid Plasma Reagin
 RIA- Radioimunoensaio
 RIQAS- Randox International Quality Assessment Scheme
 RPM- Rotações por minuto
 SGC2- Gelose Sabouraud, Gentamicina e Cloranfenicol
 SMAC- Gelose MacConkey com sorbitol
 SNC- Sistema nervoso central
 SPC-CHUC- Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
 SS- Gelose *Salmonella-Shigella*
 TEa%- Erro Máximo Admitido
 TFG- Taxa de filtração glomerular
 TnC- Troponina C
 TnI- Troponina I
 TnT- Troponina T
 TP-PA- Treponema Passive Particle Agglutination
 TR- Tempo de reptilase
 TSA- Teste de sensibilidade aos antibióticos
 TSM- Trypticase de soja
 TSMB- Trypticase de soja com sangue de carneiro
 TT- Tempo de trombina
 UFC- Unidades formadoras de colónias
 UK NEQAS- United Kingdom External Quality Assessment Service
 VCAT3- Meio para *Neisseria spp.*
 VLDL- Lipoproteína de muito baixa densidade

Resumo

O presente relatório tem como objetivo descrever o estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC), entre o mês de janeiro e o mês de junho de 2023, no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Durante o período de estágio foi possível contactar com todas as valências existentes no laboratório, nomeadamente Hematologia, Microbiologia, Imunologia e Bioquímica Clínica, permitindo consolidar e aplicar os conhecimentos obtidos durante o Mestrado. Assim, neste relatório é feita a caracterização do laboratório e a descrição das atividades desenvolvidas, principalmente nas duas áreas escolhidas: Microbiologia e Bioquímica Clínica.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Patologia Clínica, CHUC, Microbiologia, Bioquímica Clínica.

Abstract

This report aims to describe the curricular internship carried out at the Clinical Pathology Service of the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC), between January and June 2023, within the scope of the Master of Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra.

During the internship, it was possible to contact all the existing fields in the laboratory, namely Hematology, Microbiology, Immunology and Clinical Biochemistry, allowing me to consolidate and apply the knowledge acquired during the Master's degree. Thus, this report characterizes the laboratory and describes the activities carried out, mainly in the two areas chosen: Microbiology and Clinical Biochemistry.

Keywords: Clinical Analysis, Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, Clinical Pathology, CHUC, Microbiology, Clinical Biochemistry.

I. Introdução

O serviço de Patologia Clínica realiza múltiplas análises essenciais para o diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento de diversas patologias. De acordo com a história clínica (sexo, idade, raça, profissão, patologias, viagens recentes, sinais e sintomas, ...), o histórico familiar e o exame físico do paciente, são solicitados testes laboratoriais que podem ser realizados em várias amostras. Para além disso, estas amostras podem ser analisadas de formas diferentes de acordo com a área que as manipula, sendo importante a interligação dos resultados obtidos pelas diversas valências laboratoriais.

O procedimento laboratorial é dividido em 3 fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. A fase pré-analítica inclui todo o período desde a requisição das análises, preparação do doente, colheita das amostras, transporte, conservação e receção destas. A fase analítica corresponde à execução do teste laboratorial. A fase pós-analítica corresponde à avaliação e validação dos resultados, armazenamento e eliminação das amostras.

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra realizei um estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SPC-CHUC), entre janeiro e junho de 2023. Neste estágio foi possível passar por todas as áreas do laboratório, existindo uma consolidação e aplicação dos conceitos aprendidos durante o Mestrado. Apesar disso, neste relatório apenas serão aprofundadas as valências de Microbiologia e Bioquímica Clínica e apresentada uma breve caracterização do local de estágio.

2. Caracterização do Laboratório

O SPC-CHUC resulta da fusão dos serviços de patologia clínica de três unidades hospitalares: Hospital Universitário de Coimbra (HUC), Hospital Geral (HG) e Hospital Pediátrico (HP). Este serviço é dirigido pelo Doutor Fernando Manuel Ribeiro Rodrigues, médico especialista em patologia clínica, e apresenta uma equipa multidisciplinar constituída por médicos patologistas clínicos, técnicos superiores de saúde, farmacêuticos, técnicos de diagnóstico e terapêutica, assistentes operacionais e assistentes administrativos.

O estágio foi realizado no laboratório principal, situado no edifício São Jerónimo do HUC, ao qual chegam diariamente um elevado número de amostras, provenientes das urgências e das enfermarias do HUC, HG e HP, da sala de colheitas do HUC, da Maternidade Bissaya Barreto, da Maternidade Dr. Daniel de Matos e do Hospital Sobral Cid. Para além disso, recebe amostras de outras unidades de saúde da zona Centro, como o Centro Hospitalar Tondela-Viseu e a Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, para realizar análises de parâmetros

muito específicos, que laboratórios de menores dimensões não executam. Do mesmo modo, também envia amostras para entidades exteriores, como o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

O laboratório do edifício São Jerónimo é constituído por sala de espera, sala de colheitas, área de receção de amostras, CoreLab, salas de serviço administrativo, sala de lavagem de material, área de armazenamento, salas de trabalho e gabinetes de validação.

O CoreLab é uma área central do laboratório onde existe a receção, integração no sistema informático Clinidata XXI (Maxdata) e triagem de todas as amostras, que depois são encaminhadas para o setor adequado. Existem 4 setores principais: a Imunologia, a Microbiologia, a Hematologia e a Bioquímica Clínica. Os 2 últimos funcionam principalmente no CoreLab, que apresenta uma cadeia automatizada constituída por um local de integração das amostras que está ligado a diversos aparelhos. As amostras são encaminhadas pela cadeia para os respetivos aparelhos de acordo com os parâmetros a serem executados. Esta automatização permite reduzir o número de amostras colhidas por doente, diminuir os erros pré-analíticos, simplificar o fluxo de trabalho, otimizar recursos e minimizar o tempo de resposta. Apesar destes 2 setores funcionarem principalmente no CoreLab, estes apresentam salas de trabalho e gabinetes para validação de resultados, tal como acontece nos outros setores.

O Clinidata XXI é o sistema informático que permite acompanhar todo o processo laboratorial, desde a requisição das análises até ao seu resultado, permitindo realizar o rastreamento da amostra, a visualização do histórico do paciente e da informação clínica disponibilizada pelo médico, identificar pedidos em duplicado e verificar e validar resultados. Na maioria das vezes os resultados são encaminhados diretamente do aparelho para o Clinidata XXI, o que reduz a existência de erros de transcrição de resultados.

3. Controlo de Qualidade

A qualidade é a capacidade de um produto ou serviço satisfazer as necessidades do utilizador, sendo que no caso da qualidade laboratorial corresponde à capacidade de satisfazer as necessidades do médico prescriptor e do utente.¹

O controlo de qualidade é o conjunto de procedimentos pré-estabelecidos, baseados no Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL) de Patologia Clínica ou Análises Clínicas, realizados pelo laboratório de modo a detetar erros e assegurar que os resultados obtidos no laboratório são exatos, precisos e fidedignos ao longo do tempo, o que é extremamente importante, porque na maioria das vezes, o clínico apoia-se nos resultados das análises clínicas para realizar o diagnóstico e decidir a terapêutica do paciente. Este controlo deve abranger as

3 fases do procedimento laboratorial: fase pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica é a fase que estatisticamente está mais sujeita a erros e a fase analítica é a que apresenta menor quantidade de erros devido à maior automatização e ao maior controlo. Para garantir a qualidade analítica, o laboratório realiza o Controlo Interno da Qualidade (CIQ) e o Controlo Externo da Qualidade (CEQ).¹

O CIQ é um procedimento realizado no laboratório que tem como objetivo avaliar a imprecisão (Coeficiente de variação, CV%) dos métodos. De forma geral, é realizado 2 vezes ao dia, mas caso a afluência de amostras o justifique, pode ser realizado mais vezes. Este controlo é realizado com pelo menos 2 níveis, com concentrações conhecidas, que podem ser nível baixo, médio ou alto. Os resultados são expressos nas respetivas cartas de controlo, que são analisadas de acordo com as regras de Westgard. Quando estas são violadas, permitem a deteção de erros aleatórios (variação brusca do resultado) ou sistemáticos, cujas possíveis causas têm de ser averiguadas, de modo a serem implementadas ações corretivas que eliminem ou minimizem o erro. Após a implementação da ação corretiva, o controlo é reanalisado para verificar se esta foi eficiente.

O CEQ é a avaliação da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório, por um organismo externo, e permite avaliar a inexatidão (Bias%) dos métodos. Neste caso, o laboratório recebe uma amostra com resultado desconhecido que deve ser processada como uma amostra de um paciente. Após a obtenção do resultado, este é submetido na plataforma do organismo externo responsável pelo CEQ, que posteriormente, compara o resultado do laboratório com o resultado de outros laboratórios, que utilizam o mesmo método ou aparelho, e elabora um relatório que deve ser analisado pelo laboratório, de modo a verificar se os resultados fornecidos são exatos. Os diversos setores participam em vários programas de CEQ, entre os quais: United Kingdom External Quality Assessment Service (UK NEQAS) e Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS).

Com a análise estatística dos resultados obtidos no CIQ e no CEQ é possível obter, respetivamente, o CV% e o Bias%, que possibilitam o cálculo do Erro Total (ET%), com uma confiança de 95%, através da expressão $ET\% = \text{Bias}\% + 1,65 \text{ CV}\%$. Após este cálculo, o ET% deve ser comparado com o Erro Máximo Admitido (TEa%), que tem de ser previamente definido de acordo com o contexto da decisão clínica e a segurança do utente. Para que o laboratório trabalhe com qualidade é necessário que ET% seja menor que TEa%.

4. Setor de Hematologia

A Hematologia é a área da ciência que estuda os constituintes do sangue periférico e da medula óssea, permitindo realizar o diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças hematológicas. O sangue é constituído pelo plasma e pelas células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Os leucócitos dividem-se em 5 grupos principais: os neutrófilos, os linfócitos, os monócitos, os basófilos e os eosinófilos.²

Diariamente, chegam ao setor de Hematologia, amostras de sangue total colhidas em tubos distintos de acordo com as análises requeridas. As amostras de sangue total colhidas para tubos com anticoagulante K₃-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássio) são utilizadas para a determinação da velocidade de sedimentação no aparelho Ves-Matic Cube 30 e para a realização de hemogramas no analisador automático Sysmex XN-9000™. Este aparelho é constituído por quatro contadores hematológicos (três XN-10 e um XN-20), pelo Sysmex SP-10, que realiza esfregaços e os cora pela técnica de May-Grunwald-Giemsa, e pelo Sysmex DI-60, que digitaliza e analisa esses esfregaços, realizando uma pré-classificação das células deste e encaminha a sua análise para o programa CellaVision®.

O hemograma inclui a quantificação das células sanguíneas, podendo ser realizada uma contagem diferencial dos leucócitos nos seus diferentes grupos. Para além disso, são avaliadas as constantes eritrocitárias (Volume Corpuscular Médio, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, Hemoglobina Corpuscular Médio e a Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos), o hematócrito e a quantificação da hemoglobina. Quando o aparelho deteta alterações no hemograma, que justifiquem a realização do esfregaço, este é realizado, corado e digitalizado automaticamente pelo aparelho, e posteriormente, é analisado no CellaVision® pelos patologistas clínicos, permitindo a revisão da contagem diferencial e a visualização de alterações nas células. Apesar do sangue ser o principal produto analisado neste setor, este recebe líquidos biológicos, como o líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido sinovial, peritoneal, pericárdico e pleural, para a realização de contagem diferencial de células, que é realizada manualmente no Sysmex XN-9000™.

O setor da hematologia inclui, também, a área da hemostase, que recebe amostras de sangue colhidas em tubos com o anticoagulante citrato de sódio, na proporção 1:9 (Anticoagulante:Sangue). As amostras são centrifugadas a 3000 RPM durante 15 minutos para a obtenção do plasma, o que permite realizar os testes de rotina, que são: tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcialmente ativado (APTT), doseamento dos D-dímeros e fibrinogénio. Para além destes testes, são realizados outros, tais como, o doseamento dos fatores de coagulação, tempo de reptilase (TR), inibidor tipo lúpus (ITL),

tempo de trombina (TT), plasminogénio, entre outros, que necessitam que a amostra seja centrifugada duas vezes a 3000 RPM durante 15 minutos, para obtenção de um plasma pobre em plaquetas.

Tabela I - Equipamentos da hemóstase e a sua função

Equipamentos	Função
ACL TOP 750 ^{LAS}	PT; APTT; D-dímeros; Fibrinogénio; Fatores de coagulação (V, VII, VIII, IX); TT; TR; ITL; anti-Xa
ACL TOP 550 ^{CTS}	Fatores de coagulação (II, X, XI, XII, XIII)
STA R Max ²	Antitrombina 3; Plasminogénio
Sysmex CS-2500	Fatores de coagulação (Pré-caliceína e Quininogénio de alto peso molecular)

Para além disso, o setor de Hematologia apresenta o sub-setor de citogenética, que é o ramo da genética responsável pelo estudo dos cromossomas. Neste sub-setor são realizadas técnicas, como o cariótipo oncológico e o FISH (Hibridização Fluorescente in Situ), a partir de amostras de sangue ou de medula óssea colhidas em tubos com heparina de lítio. Com estas técnicas, é possível identificar alterações numéricas e/ou estruturais nos cromossomas, que auxiliam no diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças hemato-oncológicas.

5. Setor de Microbiologia

A Microbiologia é a área da ciência que estuda bactérias, vírus, fungos e parasitas.³ Na microbiologia clínica, o principal objetivo é conseguir isolar e identificar os microrganismos causadores de doença e em alguns casos realizar o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA), de modo a identificar uma terapêutica direcionada e eficaz.

O setor de Microbiologia está dividido em 7 sub-setores: Bacteriologia, Parasitologia, Micologia, Micobacteriologia, Virologia, Biologia Molecular e Serologia. Este setor apresenta uma zona de receção de amostras onde é realizada a triagem, com verificação das condições da amostra e integração das amostras no sistema informático. Esta integração permite verificar as análises requeridas e obter as etiquetas de identificação com os meios de cultura usados na primocultura dessas amostras biológicas, o que permite diminuir o erro pré-analítico. Após este passo, a amostra é encaminhada para os respetivos sub-setores.

5.1. Bacteriologia

As bactérias são microrganismos procariotas unicelulares que apresentam diferentes formas (bacilos, cocos e espiroquetas) e podem encontrar-se isolados ou agrupados (Figura 1).³

O nosso organismo é colonizado por bactérias comensais que pertencem à nossa microbiota e que defendem o nosso organismo contra agentes infecciosos. Mas, em algumas situações, estas bactérias podem causar infecção, sendo denominadas de bactérias oportunistas. Para além disso, existem as bactérias patogénicas que, independentemente do estado de saúde do doente, causam sempre infecção. Logo, é fundamental avaliar o significado clínico das bactérias encontradas nas amostras, tendo em conta a microbiota normal desse local.⁴

No laboratório de Bacteriologia, o principal objetivo é identificar as bactérias causadoras da infecção e fornecer ao clínico uma orientação terapêutica que permita tratar o doente.

I. Exame Microscópico

O exame microscópico permite avaliar a qualidade da amostra e detetar e identificar preliminarmente as bactérias. Na maioria das bactérias, as características morfológicas, como a forma e o agrupamento, e a reação tintorial à coloração podem fornecer orientações para a sua identificação.³

Exame a fresco

O exame a fresco é um exame sem uso de corantes. Numa lâmina é colocada uma gota de suspensão bacteriana que é coberta com uma lamela.³ Esta preparação é observada ao microscópio ótico com a objetiva de 40X, de modo a observar a morfologia e mobilidade dos microrganismos vivos. Para além disso, permite observar o agrupamento das bactérias e/ou a presença de outros elementos celulares da amostra.

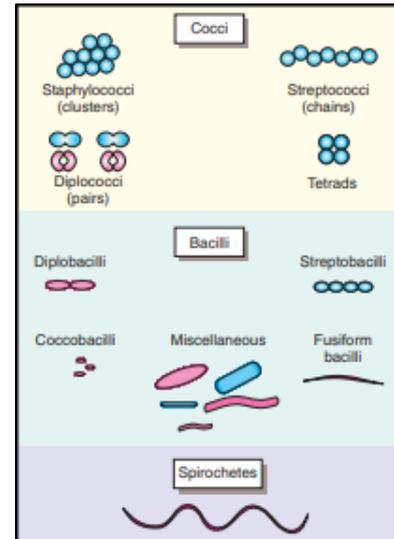


Figura 1- Formas e agrupamentos bacterianos (Adaptado de 4)

Coloração de Gram

A coloração de Gram é a coloração mais usada em Bacteriologia e apesar de permitir avaliar a morfologia das bactérias, o seu principal objetivo é permitir a diferenciação das bactérias de acordo com a sua parede celular, em Gram positivas (GP) e Gram negativas (GN).^{5,6} As bactérias GP apresentam uma parede composta por uma espessa camada de peptidoglicanos, na qual ancoram os ácidos teicóicos. Por outro lado, as bactérias GN apresentam uma parede constituída por 2 camadas: uma camada interna fina, constituída por peptidoglicanos, e uma membrana externa (exclusiva das bactérias GN), composta por proteínas, fosfolípidos e lipopolissacarídeos (LPS).^{5,6}

A coloração de Gram é realizada no sistema automático Aerospray® Gram. Antes de iniciar a coloração, as lâminas são fixadas à chama e introduzidas no carrossel do aparelho, que vai girar e permitir que todas as lâminas sejam sujeitas aos reagentes. Primeiro, existe a adição de cristal violeta, que vai corar todas as bactérias e fungos de roxo e depois há a adição de soluto de Lugol (mordente), que forma um complexo com este. Este complexo permite que quando existe a adição do descolorante álcool-acetona, as bactérias GP, devido à sua parede espessa de peptidoglicanos, permaneçam corados de roxo. Tal também acontece no caso dos fungos, pois estes são microrganismos com uma parede complexa. Já as bactérias GN, devido à sua fina camada de peptidoglicanos, são penetradas pelo descolorante e perdem a coloração. Por essa razão e de modo a distingui-las é adicionado um contracorante, a safranina ou fucsina, que vai corar de vermelho as bactérias GN.^{3,6} Posteriormente, estas lâminas são observadas ao microscópio com a objetiva de imersão de 50X, o que permite visualizar as características morfológicas dos microrganismos presentes, o seu predomínio e, quando se aplica, as células epiteliais e os leucócitos. Por vezes, é necessário recorrer à objetiva de imersão de 100X.

II. Exame Cultural

A realização do exame cultural tem de estar de acordo com o produto biológico, pelo que os meios de cultura, o tipo de sementeira e as condições de incubação são diferentes e adequadas a cada um.

Os meios de cultura podem ser divididos em 3 categorias: meios não seletivos, seletivos e diferenciais. Os meios não seletivos são meios que permitem o crescimento da maioria dos microrganismos com interesse clínico. Os meios seletivos são meios que permitem o isolamento de um microrganismo ou de um grupo de microrganismos específicos, devido à presença de substâncias, como por exemplo antibióticos ou corantes, que inibem o crescimento de outras bactérias. Os meios diferenciais são meios que permitem identificar

características metabólicas e enzimáticas das bactérias isoladas, auxiliando na identificação destas.^{3,5,6} Na Tabela II encontram-se os meios mais utilizados na Bacteriologia.

Tabela II - Meios de cultura utilizados no laboratório de Bacteriologia do HUC

Designação	Descrição
Gs (Gelose de sangue)	Meio não seletivo e diferencial, que permite identificar o tipo de hemólise que os microrganismos realizam. ⁵
CLED (Cistina, Lactose e Deficiente em eletrólitos)	Meio não seletivo e diferencial usado para isolamento e quantificação de microrganismos presentes na urina. Devido à presença de azul de bromotimol e de lactose, é possível diferenciar as colónias fermentadoras de lactose das não fermentadoras. Para além disso, a deficiência em eletrólitos impede o swarming característico do <i>Proteus spp.</i> ⁷
PVX (PolyViteX)	Meio não seletivo que promove o crescimento de bactérias fastidiosas, devido à presença de eritrócitos lisados, que libertam os fatores X e V essenciais para o seu crescimento, e do suplemento PoliVitamínico. ⁷
Hae2 (Meio para <i>Haemophilus spp.</i>)	Meio seletivo para isolamento de <i>Haemophilus spp.</i> . Este meio é similar ao PVX, mas apresenta bacitracina, que inibe a maioria dos cocos GP e GN. ⁷
HEKT (Gelose Hektoen)	Meio seletivo e diferencial para <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> Este meio contém sais biliares que inibem o crescimento de bactérias GP. A presença de lactose permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras, através de indicadores de pH (azul de bromotimol e fucsina ácida). Para além disso, a presença de citrato férrico amoniacal e tiosulfato de sódio no meio, permitem diferenciar as bactérias produtoras de sulfato de hidrogénio, que apresentam colónias com um precipitado negro no centro. ⁵
SS (Gelose <i>Salmonella-Shigella</i>)	Meio seletivo e diferencial para <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> O meio contém sais biliares, citrato de sódio e verde brilhante, que inibem as bactérias GP e as bactérias GN fermentadoras de lactose, e lactose e vermelho neutro (indicador de pH) que permitem diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras. Para além disso, contém citrato férrico amoniacal e tiosulfato de sódio, que permitem verificar se existe produção de sulfato de hidrogénio. ⁵
CIN (Gelose <i>Yersinia</i>)	Meio seletivo e diferencial para isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> nas fezes. O meio é constituído por antibióticos (CIN- cefsulodina, irgasan e novobiocina), cristal violeta e ácidos biliares, que inibem o crescimento da microbiota fecal. Este meio tem ainda, o vermelho neutro e o manitol, que permitem que a <i>Yersinia enterocolitica</i> apresente colónias rosas. ⁵
CAM (Gelose <i>Campylobacter</i>)	Meio seletivo para isolamento de <i>Campylobacter spp.</i> em amostras fecais. Este meio contém agentes antimicrobianos como a vancomicina, a polimixina B, trimetoprim e anfotericina B que inibem o crescimento da microbiota intestinal. As colónias são lisas, acinzentadas e brilhantes. ⁵
SMAC (Gelose MacConkey com sorbitol)	Meio seletivo e diferencial para isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> O157:H7. Este meio contém sais biliares e cristal violeta, que inibem a maioria das bactérias GP. Para além disso, a presença de D-sorbitol e do indicador de pH, vermelho neutro, permitem verificar se as bactérias são ou não fermentadoras de D-sorbitol. Como a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 não fermenta D-sorbitol, as suas colónias são incolores. ⁵
CNA (Gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro)	Meio seletivo e diferencial para isolamento de cocos GP. Este meio contém dois antibióticos, colistina e ácido nalidíxico, que inibem o crescimento de bactérias GN. Para além disso, como contém sangue, permite verificar a atividade hemolítica das bactérias isoladas. ^{3,5}

VCAT3 (Meio para <i>Neisseria spp.</i>)	Meio seletivo para isolamento de <i>Neisseria spp.</i> . Este apresenta eritrócitos lisados, que libertam fatores X e V essenciais para o crescimento desta bactéria e contém uma mistura de antibióticos (vancomicina, colimicina, anfotericina, trimetoprim), que inibem o crescimento de bactérias GN e leveduras. ⁷
BCSA (Gelose seletiva para <i>Burkholderia cepacia</i>)	Meio seletivo para isolamento de <i>Burkholderia cepacia</i> em amostras respiratórias de indivíduos com fibrose quística, Este meio tem como substâncias seletivas, a polimixina B, a gentamicina, a vancomicina e o cristal violeta, que inibem a maioria da microbiota respiratória. As colónias características da <i>Burkholderia cepacia</i> são roxas com um alo amarelo. ⁵
SGC2 (Gelose Sabouraud, Gentamicina e Cloranfenicol)	Meio seletivo para isolamento de fungos. Este meio contém cloranfenicol e gentamicina, que inibem o crescimento bacteriano. ⁷
TSM (Trypticase de soja)	Meio não seletivo usado para o controlo dos TSA dos bacilos.
TSMB (Trypticase de soja com sangue)	Meio não seletivo usado para o controlo dos TSA dos cocos.
MHE (Gelose Mueller-Hinton)	Meio não seletivo para realização de TSA manuais de bactérias não exigentes (enterobactérias, bacilos GN não fermentadores, estafilococos...).
MHF (Mueller-Hinton + 5% Sangue de cavalo + 20mg/l β -NAD*)	Meio para realização de TSA manuais de bactérias fastidiosas (pneumococos e outros estreptococos, <i>Haemophilus spp.</i> e <i>Moraxella spp.</i>).
CDC	Meio não seletivo para isolamento de bactérias anaeróbicas exigentes, principalmente para aqueles que são cocos GP. ^{5,7}
KV (Kanamicina e Vancomicina)	Meio seletivo para isolamento de bactérias GN anaeróbicas obrigatórias, devido à presença dos antibióticos kanamicina e vancomicina. ^{5,7}
NE (Não esporuladores)	Meio seletivo para bactérias anaeróbicas não esporuladoras.

Existem vários tipos de sementeira em meio sólido que são escolhidas de acordo com o produto biológico a ser semeado e têm como objetivo obter colónias isoladas. Temos a sementeira semi-quantitativa (Figura 2- A), que é usada apenas nas amostras de urina, a sementeira por técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície de um meio sólido (Figura 2- B), que é a técnica usada para a maioria dos produtos, a sementeira por rolamento, que só é usada no caso dos cateteres e a sementeira em toalha (Figura 2- C), que é realizada na execução dos TSAs manuais. No caso do LCR, é realizada a sementeira por inundação, porque as amostras de LCR contêm microrganismos em baixas quantidades e como este é um líquido estéril, tudo é valorizado.

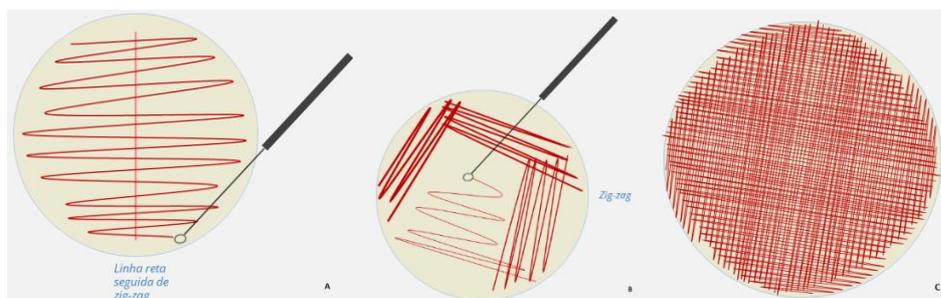


Figura 2- A- Sementeira semi-quantitativa. B- Sementeira por técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície de um meio sólido. C- Sementeira em toalha. (Adaptado de 8)

Após serem semeados, os meios de cultura são incubados para permitir crescimento bacteriano. Para que este ocorra de modo eficaz, é necessário fornecer as condições de incubação apropriadas, tendo em conta as características da amostra e dos microrganismos que queremos recuperar. Dentro destas condições, as mais críticas são a disponibilidade de oxigénio (O_2) e de dióxido de carbono (CO_2), a temperatura, o pH e a humidade.^{4,5}

Relativamente à necessidade de O_2 , as bactérias podem ser aeróbias, anaeróbias facultativas, microaeróbias ou anaeróbias estritas. Na clínica, a maioria das bactérias relevantes são anaeróbias facultativas, isto é, crescem na presença ou na ausência de O_2 , mas também existem bactérias aeróbias (*Pseudomonas spp.*, *Brucella spp.*, ...), que necessitam de uma atmosfera com O_2 para crescer. Para além destas, existem as bactérias microaeróbias, que necessitam de baixos níveis de O_2 , como a *Campylobacter spp.*. As bactérias anaeróbias estritas necessitam de um ambiente com ausência de O_2 , mas neste grupo existem bactérias aerotolerantes, que conseguem crescer um pouco na presença de O_2 .⁴

A disponibilidade de CO_2 pode condicionar o crescimento de algumas bactérias, nomeadamente, as bactérias capnofílicas, que necessitam de concentrações de CO_2 de 5 a 10%, de modo que haja crescimento bacteriano.⁴

Em relação à temperatura, a maioria dos meios de cultura são incubados a temperaturas entre os 35°C e os 37°C pois as bactérias multiplicam-se melhor à temperatura corporal. Para alguns meios podem ser utilizadas temperaturas diferentes, de modo a melhorar o isolamento e recuperação de alguns microrganismos. Um exemplo, é o caso do meio CAM, que é incubado a 42°C, de modo a isolar o *Campylobacter spp.*, pois este é capaz de crescer a esta temperatura, ao contrário da maior parte das bactérias existentes na microbiota intestinal.⁴

O pH é um parâmetro que não é controlado pelo laboratório, pois os meios comercializados têm tampões, que permitem que os meios apresentem o pH ideal para o crescimento das bactérias, que é entre 6,0 e 7,5.⁴

No que diz respeito à humidade, esta deve ser mantida durante toda a incubação, porque as bactérias necessitam de água para que as suas vias metabólicas essenciais se mantenham ativas e para que não ocorra lise celular.

Para além dos meios sólidos, existem meios líquidos que estimulam o crescimento de determinados microrganismos, permitindo maximizar a deteção das bactérias de interesse.⁵ Na Tabela III encontram-se os caldos de enriquecimento utilizados em Bacteriologia.

Tabela III - Caldos de enriquecimento utilizados no laboratório de Bacteriologia

Caldos	Descrição
CBGN (Caldo de bacilos Gram negativos)	Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> a partir de amostras fecais. Este meio contém citrato e desoxicolato de sódio, que inibem o crescimento de bactérias Gram positivas, e manitol, que favorece o crescimento das bactérias fermentadoras de manitol. ⁵
BHI (Brain Heart Infusion)	Caldo de enriquecimento, constituído por uma infusão de cérebro e coração de boi, glucose e peptonas, que permite o crescimento de microrganismos não fastidiosos ou fastidiosos, e aeróbias ou anaeróbias. ^{4,5,7}
CM (Caldo Cooked Meat)	Caldo de enriquecimento para cultura e recuperação de microrganismos anaeróbios. Este meio apresenta partículas de carne, que permitem determinar a atividade proteolítica, através do escurecimento e desintegração destas. ^{5,7}

Em meios líquidos a inoculação é por dispersão da amostra, de modo a permitir crescimento e recuperação dos microrganismos. Posteriormente, estes meios são incubados a 37°C na estufa. O meio CBGN, após a incubação durante no mínimo 6h, é repicado para os meios SS e HEKT. Já o meio BHI e o meio CM é analisado após 18 a 24h de incubação, podendo permanecer na estufa ou ser repicados para meios sólidos. Para decidir se estes meios são ou não repicados é necessário ter em conta o que foi observado na coloração de Gram e o próprio meio, tendo em conta a turvação e a produção de gás, que pode ou não acontecer.

III. Identificação dos microrganismos

O primeiro passo para a identificação dos microrganismos é a avaliação da morfologia das colónias nos meios de cultura primários, que ocorre após 18 a 24h de incubação, salvo algumas exceções.^{4,5} Nesta avaliação são observadas características morfológicas como: a pigmentação, o tamanho, a forma, a aparência da superfície da colónia (brilhante, seca, mucosa...) e as alterações do meio resultantes do crescimento bacteriano, como o padrão hemolítico, a corrosão da superfície do meio ou a alteração da cor dos indicadores de pH.⁴ Embora a avaliação macroscópica das colónias seja importante, esta não deve ser vista como forma ideal de realizar uma identificação presuntiva do microrganismo, pois existem microrganismos de espécies diferentes que apresentam colónias indistinguíveis e microrganismos da mesma espécie que apresentam diversidade morfológica.^{4,5}

Após a avaliação da morfologia das colónias, é realizada a identificação definitiva do microrganismo utilizando o equipamento automatizado MALDI Biotyper[®], que utiliza a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight). Para a realização desta identificação é necessário colocar uma pequena quantidade da colónia de interesse na placa e de seguida adicionar uma matriz, que absorve energia e fixa a amostra, quando seca.^{9,10} Nalguns casos, entre a colónia e a matriz, é adicionado ácido fórmico, de modo a destruir a parede celular e/ou a cápsula das bactérias, para facilitar a libertação das proteínas, que vão ser usadas para realizar a identificação das bactérias. Juntamente com as colónias de interesse é analisada também uma estirpe de *Escherichia coli* com duas proteínas de alto peso molecular, a BTS, que funciona como controlo interno. Caso o resultado do controlo não seja o correto, também não serão realizadas as restantes identificações.

Quando a placa é introduzida no aparelho, esta é sujeita à ação de um laser, que vai permitir que exista a dessorção e ionização da amostra, transformando-a numa matéria volátil com proteínas ionizadas. Estes iões são acelerados por um campo elétrico ao longo de uma câmara de vácuo até ao detetor do equipamento, que determina o tempo de voo, que é diferente entre proteínas e depende da massa e da carga destas. Isto permite obter um espectro das proteínas do microrganismo, que é comparado com a base de dados do sistema, permitindo a identificação deste.^{5,9,10}

Quando é realizada a identificação do microrganismo, é necessário avaliar o resultado de acordo com a amostra e a história clínica do doente.⁵

IV. Testes de Suscetibilidade aos antibióticos (TSA)

Caso se conclua que o microrganismo é responsável pela infeção é realizado o TSA, de modo a fornecer uma orientação terapêutica.⁵ Para a realização do TSA e interpretação dos resultados, o laboratório segue as normas fornecidas pela EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Para a maioria das bactérias é realizado o TSA automático no sistema MicroScan WalkAway DxM 1096, da Beckman Coulter, que utiliza uma metodologia de microdiluição para obter diretamente a concentração mínima inibitória (CMI). No entanto, existem exceções em que é realizado o TSA manual, como quando as bactérias são fastidiosas, apresentam crescimento lento, o TSA automático falha ou não existe painel adequado para o microrganismo.

Para a realização do TSA automático é necessário preparar uma suspensão bacteriana a partir de uma cultura pura obtida de um meio isento de antibiótico. Posteriormente, com o

auxílio de um dispositivo adequado é adicionada a suspensão bacteriana nos micropoços do painel, que deve ser escolhido de acordo com o microrganismo. Estes painéis apresentam diferentes antibióticos liofilizados nos micropoços e em diferentes concentrações. Após a preparação do painel, este é introduzido no aparelho, que o incuba a 35°C e que durante 18h vai realizar leituras de adsorvância para avaliar o crescimento bacteriano. Após as 18h, o aparelho realiza a leitura de todos os poços e determina a CMI, que é a concentração mais baixa de antibiótico que impede o crescimento bacteriano. Tendo em conta as normas da EUCAST, o sistema avalia automaticamente se o microrganismo é sensível, intermédio ou resistente para cada antibiótico.

Em relação ao TSA manual, este é realizado utilizando o método de difusão em disco ou de tiras E-test. Primeiramente, é essencial preparar uma suspensão bacteriana em soro fisiológico com uma densidade de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL) a partir de um meio não seletivo com uma cultura pura. Em seguida, esta suspensão é inoculada por sementeira em toalha no meio MHE, meio de referência para a realização do TSA. No caso dos microrganismos fastidiosos é utilizado o meio MHF, que promove o seu crescimento. Após a inoculação do meio, são colocadas as tiras E-test e/ou os discos dos antibióticos selecionados para o microrganismo em estudo, que se encontram pré-definidos de acordo com as normas da EUCAST. Por fim, os meios são incubados a 37°C durante 18h numa atmosfera normal ou capnofílica caso se trate do meio MHE ou MHF, respetivamente.

Após as 18h, os TSA são avaliados de forma diferente de acordo com o método utilizado. O método de difusão em disco consiste na aplicação de um disco impregnado com uma concentração conhecida de antibiótico que difunde no meio inoculado com a suspensão bacteriana, formando um gradiente de concentração (a concentração de antibiótico vai diminuindo à medida que se afasta do disco). Ao incubar o meio nas condições adequadas, existe o crescimento bacteriano nas regiões onde o antibiótico não inibe a bactéria, formando-se um halo de inibição em torno do disco (Figura 3- A). Para realizar a interpretação dos resultados, o diâmetro deste halo deve ser medido em milímetros após as 18h e comparado com os pontos de corte fornecidos pela EUCAST, de modo a classificar a bactéria como resistente, intermédia ou sensível ao antibiótico. Já as tiras E-test têm impregnado um gradiente de concentração de antibiótico, que se encontra representado na tira através de uma escala. O antibiótico difunde no meio, tal como acontece nos discos e forma-se uma elipse de inibição em torno da tira. Como estas tiras apresentam uma escala, após as 18h é possível medir a CMI em mg/L, que corresponde à interseção da elipse com a tira no ponto de menor concentração (Figura 3- B). Tal como nos discos, a interpretação baseia-se nas

normas da EUCAST.^{5,6} Com esta informação e de acordo com a medicação disponível, o clínico escolhe qual o fármaco mais adequado para o tratamento da infeção em causa.

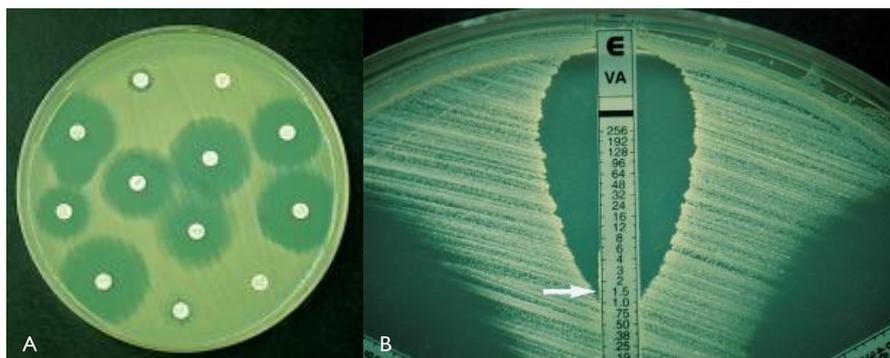


Figura 3- A- TSA realizado com o método de difusão em disco.
B- TSA realizado com o método de tiras E-test. (Adaptado de 4)

Quando é realizado o TSA, seja este automático ou manual, é realizado também um controlo em TSM, para a maioria dos microrganismos, ou TSMB, para os microrganismos fastidiosos, que permite avaliar se a suspensão bacteriana utilizada é pura. Caso tal não se verifique é necessário realizar o isolamento das colónias de interesse e repetir o TSA.

V. Amostras biológicas

As infeções bacterianas podem ocorrer numa grande variedade de órgãos e por essa razão, existe uma grande diversidade de produtos que podem ser analisados. Em seguida, encontram-se descritos os procedimentos para as amostras mais utilizadas.

Urina

A infeção do trato urinário (ITU) é uma das infeções mais comum e por essa razão, a urina é a amostra que chega mais frequentemente ao laboratório. Esta infeção ocorre principalmente nas mulheres porque como a uretra é mais curta e localiza-se perto da região anal, os microrganismos têm uma maior facilidade de entrar pela via ascendente. O número de ITUs aumenta nos homens com a idade, sendo a idade avançada considerada um fator de risco, tal como a gravidez, a transplantação renal, as alterações do trato geniturinário e a cateterização.^{5,6}

As ITUs podem ser classificadas de acordo com a localização, podendo ser infeções do trato inferior, envolvendo a bexiga (cistite), a uretra (uretrite) ou, no homem, a próstata (prostatite), ou do trato superior, envolvendo o parênquima renal (pielonefrite) ou os ureteres (ureterite).⁵ Dentro destas, a cistite é a mais comum e a pielonefrite é a mais grave, podendo levar à falência do rim.

Para realizar o diagnóstico de uma ITU, a amostra mais utilizada é o jato intermédio da 1ª urina da manhã, que deve ser colhido para um contentor esterilizado, após higienização da

região genital. A urina pode ser obtida de outras formas, como por saco coletor, punção de cateter, aspiração suprapúbica ou nefrostomia. A urina colhida é transferida para tubos com ácido bórico, que inibe a proliferação bacteriana e permite que a urina permaneça viável para análise durante 24h.

Quando as amostras de urina mais utilizadas (jato intermédio da 1ª urina da manhã) chegam ao laboratório, é necessário avaliar se estas devem ser cultivadas. Para isso, estas são colocadas no aparelho automatizado Sysmex UF-5000™ para realização da urina tipo II. Neste aparelho é avaliada a presença de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, bactérias, entre outros, por citometria de fluxo fluorescente com foco hidrodinâmico. As amostras que não apresentam características sugestivas de infeção não são cultivadas, tendo uma resposta especial, mas caso o clínico apresente argumentos válidos, pode contactar o laboratório para ser realizada sementeira. Já as amostras que apresentam características sugestivas de infeção, nomeadamente bacteriúria e leucocitúria, são introduzidas no aparelho DxM 6100 Autoplak, que executa automaticamente uma sementeira semi-quantitativa, utilizando 1 µL de urina, em meio Gs e CLED. Estas placas são incubadas a 37°C durante 18 a 24h, em aerobiose, e posteriormente são avaliadas como na Tabela IV. Após esta avaliação, caso a urocultura seja positiva é avaliada a morfologia das colónias. Caso as colónias sejam todas iguais considera-se que a cultura está pura e pode ser realizada a identificação e o TSA. Caso esta não seja pura, tem de se repicar as colónias para meio adequado, nomeadamente meio Gs para cocos e meio CLED para bacilos, de modo a posteriormente realizar a identificação e o TSA.

Tabela IV - Avaliação do crescimento de microrganismos em uroculturas

Colónias	Resultado
Sem crescimento	Negativo
1 a 10 colónias (<10 ⁴ UFC/mL)	Significado clínico depende da história clínica
10 a 100 colónias (10 ⁴ a 10 ⁵ UFC/mL)	Positivo consoante a história clínica
>100 colónias (>10 ⁵ UFC/mL)	Positivo
>2 tipos de colónias	Polimicrobiano (Urina contaminada)

Quando a amostra é pediátrica, esta é diretamente semeada nos meios acima descritos e é realizado um screening no aparelho HB&L® (ALIFAX). Para isso, a urina é introduzida em frascos com caldo Mueller-Hinton e colocada no aparelho, que o incuba a 37°C, o que permite que ocorra a multiplicação dos microrganismos presentes. Este aumento de bactérias provoca um aumento da turbidez, que é medida pelo aparelho, fornecendo resultados em 3 a 5h.

No SPC-CHUC, as bactérias mais associadas às ITUs são *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus spp.*.

Fezes

A diarreia aguda é um dos sintomas mais avaliados pelos médicos de família, podendo ou não ter origem infecciosa. Na maioria dos doentes, a diarreia é autolimitada, mas por vezes, alguns pacientes desenvolvem problemas mais severos, como bacteriemia e desidratação. Quando tal se verifica, é necessário avaliar a história clínica, o exame físico e as viagens recentes, de modo a afunilar o diagnóstico. Se o médico desconfiar de uma infecção gastrointestinal causada por bactérias, é necessário que o paciente colha uma amostra de fezes para um contentor estéril e sem conservantes. Esta amostra deve ser representativa, apresentando pus ou sangue, caso exista.⁵

Quando as fezes chegam ao laboratório, são avaliadas relativamente à consistência (dura, mole, líquida) e à presença de pus e/ou sangue e, posteriormente, é realizada a coprocultura em meios apropriados. Como as fezes são ricas em microrganismos da microbiota intestinal, é necessário o uso de meios seletivos, para selecionarem as bactérias que causam mais habitualmente infeções gastrointestinais, que são: *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, a *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 e *Yersinia enterocolitica*.⁵ Para a identificação destes microrganismos são utilizados meios seletivos e diferenciais, que apresentam substâncias que permitem distinguir de outros microrganismos. Estes meios são inoculados utilizando a técnica de esgotamento de produto por extensão à superfície de um meio sólido.

Para pesquisa de *Salmonella spp.* e de *Shigella spp.*, as fezes são inoculadas nos meios SS, HEKT e CBGN e incubadas a 37°C, numa atmosfera aeróbica. O CBGN é um caldo de enriquecimento seletivo que favorece o crescimento destes microrganismos e que após 6h é repicado para os meios SS e HEKT. Os meios SS e HEKT são incubados durante 18 a 24h e posteriormente, são analisados. Como estes 2 meios contêm lactose, permitem distinguir as bactérias fermentadoras de lactose das não fermentadoras. Como a *Salmonella spp.* e a *Shigella spp.* não são fermentadoras da lactose as suas colónias permanecem incolores. Para distinguir entre as 2 espécies, os meios contêm ainda citrato férrico amoniacal, que reage com o sulfato de hidrogénio produzido pela *Salmonella spp.*, dando origem a um precipitado negro no centro da colónia incolor.⁵

Para pesquisa de *Yersinia enterocolitica* e de *Campylobacter spp.*, são usados os meios CIN e CAM, respetivamente. O meio CIN é incubado a 37°C durante 18 a 24h, numa atmosfera aeróbia e o meio CAM é incubado a 42°C durante 48h, numa atmosfera de microaerofilia.⁵

Por fim, as amostras pediátricas são cultivadas, adicionalmente, em meio SMAC para pesquisa de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7, que é incubado a 37°C durante 24h, numa atmosfera aeróbia.

Todos estes meios sólidos podem, caso seja necessário, ser reincubados até 48h.

Sangue

A bacteremia é caracterizada pela presença de bactérias na corrente sanguínea, que é evidenciada por um resultado positivo numa hemocultura. Na maioria das vezes, esta bacteremia é transitória e não apresenta quaisquer consequências, mas caso evolua pode dar origem a uma sepsis, que é uma infecção associada a uma resposta inflamatória sistémica.¹¹

A colheita de sangue para uma hemocultura tem de ser realizada em condições de assepsia, de modo a evitar contaminações. Para isso, é necessário desinfetar a pele no local da punção e a garrafa da hemocultura antes da colheita. No HUC são utilizadas as garrafas Bact/Alert® FA Plus, que contêm um meio de cultura que proporciona um ambiente ideal para a recuperação de diversos microrganismos, mas para que este consiga recuperá-los é necessário respeitar o volume de amostra. Num adulto, o volume colhido deve ser entre 5 e 10mL e devem ser realizadas 2 hemoculturas colhidas em locais diferentes para melhor avaliação. Numa criança, o volume colhido tem por base o peso desta, sendo entre 1 e 4mL.⁵

As garrafas de hemocultura quando chegam ao laboratório são introduzidas no aparelho Bact/Alert® Virtuo® (bioMérieux), que as incuba a 37°C. Este aparelho tem a capacidade de realizar a leitura através de sensores de emulsão líquida existentes no fundo da garrafa, que mudam de cor irreversivelmente quando o pH diminui devido ao aumento do CO₂, produzido pelos microrganismos. Esta leitura é realizada a cada 10 minutos e permite detetar as hemoculturas positivas precocemente. Quando as hemoculturas não apresentam crescimento durante 5 dias, são consideradas negativas.

Quando as hemoculturas são positivas é realizado um esfregaço para coloração de Gram, que pode fornecer informações sobre o microrganismo em causa, e uma cultura em meio Gs, que é incubado durante 18 a 24h a 37°C numa atmosfera capnófila (5% de CO₂). Em algumas situações, o esfregaço pode sugerir que também se realize a sementeira em 2 placas de PVX que são incubadas em atmosfera capnófila e em anaerobiose, respetivamente.

A avaliação do resultado das hemoculturas deve ter em conta todas as hemoculturas realizadas pelo doente. Quando os microrganismos identificados pertencem à microbiota da pele, como os estafilococos coagulase negativa, é necessário realizar uma avaliação cuidadosa dos resultados. Quando os microrganismos detetados são patogénicos, como *Staphylococcus aureus*, enterobactérias, *Enterococcus spp.*, o doente está provavelmente infetado.

Adicionalmente, algumas das hemoculturas positivas, consideradas suspeitas de sépsis e hemoculturas pediátricas, são introduzidas no aparelho Accelerate PhenoTest®, que permite identificar o microrganismo e realizar o TSA diretamente da amostra. Este aparelho permite obter resultados mais rápido, devido à utilização de duas técnicas, a electrofiltração em gel e o FISH, que permitem, respetivamente, a limpeza da amostra e a identificação do

microrganismo. Após a identificação, os microrganismos são sujeitos a uma seleção de antibióticos e é analisada a sua resposta a eles, obtendo-se as CMI.¹²

LCR

As infecções do sistema nervoso central (SNC) são emergências médicas que podem colocar em risco a vida do paciente e por essa razão, devem ser diagnosticadas rapidamente. As mais comuns são as meningites (inflamação das meninges), as encefalites (inflamação do encéfalo) e as meningoencefalites (inflamação das meninges e do encéfalo).⁵

Para realizar o diagnóstico de uma infecção do SNC devem ser realizados estudos citológicos, bioquímicos e microbiológicos a partir de LCR colhido por punção lombar para um contentor estéril. Este deve ser colhido em condições de assepsia de modo a evitar contaminações, pois este é um líquido estéril em que todos os microrganismos observados são valorizados, e deve ser imediatamente enviado para o laboratório à temperatura ambiente. No laboratório, é avaliada a turbidez e a cor do LCR e após separação de amostra para o citológico, o LCR é centrifugado, a 2500 RPM durante 10 minutos. O sobrenadante é enviado para a bioquímica, para determinar a concentração de glicose e de proteínas. A partir do sedimento é realizado um esfregaço para coloração de Gram, que permite obter uma identificação presuntiva dos microrganismos, o que permite iniciar terapêutica empírica. Tal é possível, pois os microrganismos mais comumente associados a infecções do SNC, como a *Neisseria meningitidis* (diplococos GN), o *Haemophilus influenzae* (cocobacilos GN) e o *Streptococcus pneumoniae* (diplococos GP), apresentam características típicas.⁵ Para além disso, este é inoculado por inundação em meio Gs e PVX e por dispersão no meio BHI. Estes meios são incubados a 37°C durante 24 a 72h e avaliados. Caso exista crescimento, é realizada a identificação e o TSA.

Outros líquidos biológicos

Para além do sangue e do LCR, o organismo humano apresenta outros líquidos biológicos geralmente estéreis, como o líquido peritoneal (da cavidade abdominal), pericárdico (da cavidade cardíaca), pleural (da cavidade torácica) e sinovial (da cavidade articular). Quando existe uma infecção nestes locais, há um aumento da quantidade de líquido e é realizada uma punção desse líquido em condições de assepsia para um contentor estéril e em alguns casos, para uma garrafa de hemocultura.⁴ Esta amostra é sujeita a uma análise bioquímica, citológica e microbiológica.

Quando chegam ao laboratório de Bacteriologia, é realizado um esfregaço para coloração de Gram e os líquidos pericárdico, pleural e sinovial são cultivados em Gs, PVX e BHI e o

líquido peritoneal é cultivado em Gs e CM. Estes meios são incubados a 37°C durante 24 a 72h e avaliados.

Zaragoas de feridas e aspirados de feridas e exsudados profundos

As feridas e os exsudados profundos podem conter uma grande quantidade de bactérias, pois estas dependem do local e do tipo de infecção e da história clínica do doente. Quando a ferida é superficial, a amostra deve ser colhida com uma zaragatoa e colocada em meio de transporte, após limpeza da ferida. Mas se forem feridas ou exsudados profundos, deve ser realizada uma punção e a amostra deve ser colocada em frascos Portagerm™.

No laboratório é realizado um esfregaço para coloração de Gram e todas estas amostras são inoculadas em Gs. Para amostras mais profundas, como o pus de abcesso e o aspirado de feridas, é realizada, adicionalmente, a inoculação em meio CM, pois estes locais podem ser infetados por microrganismos anaeróbios.

Produtos do trato respiratório

O trato respiratório pode ser dividido em trato respiratório superior, que inclui o nariz, a cavidade nasal, a faringe e a epiglote, e em trato respiratório inferior, que inclui a laringe, a traqueia, os brônquios e os pulmões. As infecções do trato respiratório superior são mais comuns, mas são menos perigosas que as infecções do trato respiratório inferior.^{5,6}

Para o diagnóstico de infecções do trato respiratório podem ser colhidas 3 tipos de amostras: a expetoração, o lavado broncoalveolar (LBA) e o aspirado brônquico (AB). A expetoração é a amostra mais comum e deve ser colhida logo pela manhã pelo paciente, após este lavar a boca com água, de modo a diminuir a contaminação com fibras da orofaringe. Esta deve resultar de tosse produtiva profunda e ser colhida diretamente para o contentor estéril, de modo a diminuir a contaminação com microbiota da boca e saliva. Como a expetoração é facilmente contaminada, é necessário realizar uma avaliação da qualidade da amostra através de um esfregaço corado por Gram, observado com a objetiva de 10X. Nesta avaliação tem-se em conta a presença de leucócitos e de células epiteliais e a flora existente. Quando as amostras apresentam mais de 25 células epiteliais por campo são consideradas contaminadas com saliva, sendo rejeitadas para análise microbiológica. A presença de mais de 25 leucócitos por campo é sugestiva de doença infecciosa. Logo, as amostras com menos de 25 células epiteliais e mais de 25 leucócitos por campo, prosseguem para análise microbiológica.

O LBA e o AB são amostras colhidas por pessoal especializado através de métodos invasivos. O LBA é obtido através de lavagem dos alvéolos com soro fisiológico e o AB é obtido por aspiração nos bronquíolos. Como são amostras colhidas diretamente de um local

sem microbiota local, estes são menos contaminados. Apesar disso, também é realizado um esfregaço para coloração de Gram para avaliar a qualidade das amostras. Nestas, deve existir uma baixa quantidade de microrganismos.

Para além da coloração de Gram, a expetoração com boa qualidade e o AB são semeados em meio Gs e em Hae2 e o LBA é semeado em Gs e em PVX. Estes meios são incubados a 37°C durante 24 a 48h, numa atmosfera aeróbica. Nestas culturas, os principais microrganismos valorizados são *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*. Após identificação, é realizado o TSA.

As amostras de doentes com fibrose quística ou com doença pulmonar obstrutiva crónica são inoculadas também em meio BCSA, para pesquisa de *Burkholderia cepacia*, e em SGC2, para pesquisa de fungos.

Exsudados vaginais e uretrais

As infeções do trato genital podem ter origem endógena, sendo causadas por alterações de fatores, como o pH, a dieta, entre outros, que alteram a microbiota local, ou ter origem exógena, sendo causadas por organismos transmitidos por contacto sexual. As infeções de origem exógena são conhecidas por infeções sexualmente transmissíveis (ISTs) e podem ser causadas por uma diversidade de microrganismos, nomeadamente *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae* e *Trichomonas vaginalis*.^{5,6}

Para realizar o diagnóstico de uma infeção do trato genital é necessário a colheita do exsudado com uma zaragatoa, que deve ser colocada em meio de transporte apropriado e ser enviada para o laboratório rapidamente, de modo que os microrganismos permaneçam viáveis. Isto é extremamente importante, principalmente para a deteção da *Trichomonas vaginalis*, um parasita que é observado no exame a fresco, devido ao seu movimento característico. Para além disso, é realizado um esfregaço para ser corado por Gram, de modo a avaliar semi-quantitativamente a presença de células epiteliais e leucócitos e o tipo de microrganismos presentes na amostra, e a amostra é inoculada em meio Gs, VCAT3 e CNA. Estes meios permitem selecionar as principais bactérias associadas às ISTs, sobretudo a *Neisseria gonorrhoeae* com o meio VCAT3 e cocos GP com o meio CNA. Estes meios são incubados durante 18 a 48h, a 37°C, numa atmosfera capnófila. Caso se verifique crescimento sugestivo é realizada a identificação e o TSA.

5.2. Micobacteriologia

As micobactérias são bacilos aeróbios, não formadores de esporos e imóveis, que têm uma parede celular constituída sobretudo por ácidos micólicos. Como a parede celular destas bactérias é extremamente rica em lípidos e ácidos micólicos, que criam uma barreira hidrofóbica, estas são dificilmente coradas com as colorações usualmente usadas. No entanto, usando uma coloração própria, aumentando o tempo de exposição ao corante ou aquecendo, estes bacilos podem ser corados, mas não podem ser descorados usando uma solução ácido-álcool, e por isso, são designados bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR).^{3,4,5}

A tuberculose continua a ser um problema de saúde pública, porque a contaminação ocorre facilmente por inalação de aerossóis contaminados. Normalmente, os indivíduos contaminados não desenvolvem a doença imediatamente, tendo de existir uma diminuição da capacidade do sistema imunitário, para existir doença. As tuberculoses são causadas pelas micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMBT), que inclui *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae* e *M. microti*.^{4,5}

Como as micobactérias podem infetar quase todos os órgãos e tecidos do organismo, as amostras biológicas que chegam ao laboratório são diversas. No entanto as mais comuns são as amostras respiratórias (expetorações, LBA e AB). Para além destas, chegam urinas, fezes, punções ganglionares, LCR, sangue, entre outras.⁴ Como já foi referido, estas bactérias causam facilmente infeção, e por essa razão, todas as etapas de manipulação das amostras devem ser realizadas na câmara de fluxo laminar.

Processamento das amostras

A maioria destas amostras, necessitam de um processamento prévio, que inclui liquefação (destruição do muco e das células), descontaminação e concentração. Para isso, é utilizado o Kit BD BBL™ MycoPrep™, que contém um reagente composto por hidróxido de sódio a 2%, que atua como agente descontaminante e mucolítico, por N-acetil-L-cisteína (NALC), que é também um agente mucolítico, e por citrato de sódio, que liga os iões de metais pesados que podem inibir a ação da NALC. Ao adicionar este reagente, existe um aumento do pH, que leva à destruição de tudo, menos os BAAR. Após a adição do reagente, a amostra é agitada num vortex, o que facilita a liquefação. Depois de 20 minutos em repouso, adiciona-se tampão fosfato, para diminuir o pH e parar o processo de liquefação e descontaminação, e centrifuga-se a 3000g durante 15 minutos, obtendo-se o sedimento.^{3,13}

Existem amostras que não são sujeitas a este processamento, como é o caso do LCR, que é apenas centrifugado, de modo a obter o sedimento que será processado como os restantes produtos⁴ e do sangue, que é colhido diretamente para as garrafas de hemocultura BD

BACTEC™ Myco/F Lytic Culture Vials (caldo Middlebrook 7H9 e BHI). Estas garrafas são colocadas no aparelho BACTEC™ 9120, que as mantém a 35°C e em constante agitação durante 42 dias. Caso exista crescimento, o aparelho deteta a fluorescência de um sensor que existe no interior das garrafas. Esta fluorescência ocorre devido à diminuição de O₂, resultante do crescimento e metabolismo das micobactérias.¹⁴

Exame microscópico

O exame microscópico da amostra processada é considerado um método sensível e rápido para identificação presumível de *Mycobacterium spp.*. Como já foi referido, as micobactérias são dificilmente coradas com colorações normalmente usadas pelo laboratório, e por isso, é necessário utilizar colorações específicas., como a coloração de Ziehl-Neelsen e a coloração de Kinyoun. Estas duas técnicas são semelhantes entre si, sendo a única diferença no primeiro passo. Apesar de em ambas as técnicas ser utilizado como corante primário, a carbol-fucsina (mistura de fenol e fucsina básica), na coloração de Ziehl-Neelsen é necessário utilizar o calor, para facilitar a entrada do corante nas bactérias. Já na coloração de Kinyoun, a utilizada no HUC, o corante primário apresenta uma maior concentração de fenol, o que facilita a entrada do corante, não sendo necessário o uso de calor. Posteriormente, realiza-se uma lavagem com um descolorante (ácido-álcool), que permite que apenas as BAAR fiquem coradas de vermelho e adiciona-se um corante de contraste (o azul de metileno), que permite que tudo o resto fique azul.^{4,6}

Exame cultural

Além da coloração, as amostras processadas são inoculadas no meio líquido MGIT (Indicador de crescimento de micobactérias) e no meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ), o que permite aumentar a probabilidade de recuperar as micobactérias.

O meio MGIT é um caldo de Middlebrook 7H9 modificado que contém um composto, que emite fluorescência quando há diminuição de oxigénio.^{4,15} Para tornar o meio mais seletivo para as micobactérias, antes de ser usado, o meio é enriquecido com um suplemento, que contém ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catalase, e com uma mistura de antibióticos e de antifúngicos, denominada PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina). O uso do suplemento e do PANTA favorece o crescimento das micobactérias e inibe a flora normal da amostra, respetivamente. Depois de inoculado, o meio MGIT é incubado a 37°C. num ambiente capnófilico, durante um máximo de 42 dias, no aparelho BACTEC™ MGIT™ 960, um sistema automático que identifica as culturas positivas, através da deteção da fluorescência emitida.¹⁵

O meio LJ é usado para isolamento e diferenciação das micobactérias. Este meio sólido contém verde de malaquite e sais biliares, que inibem o crescimento de microrganismos contaminantes. Para além disso, contém ovo, glicerol e farinha de batata, que fornecem nutrientes que favorecem o crescimento das micobactérias.^{4,5,7} Este meio é colocado numa estufa a 37°C com atmosfera capnofílica durante um máximo de 42 dias, e é avaliado semanalmente. Quando é verificado crescimento, é avaliada a taxa de crescimento, a pigmentação e a morfologia da colónia, o que fornece informações essenciais para a identificação das micobactérias.⁴

Quando existe uma cultura positiva para qualquer um dos meios (MGIT, LJ ou meio de hemocultura de micobactérias), realiza-se um esfregaço para coloração de Kinyoun, para confirmar a existência de BAAR, e inocula-se um meio GS, para confirmar que a positividade não é devido a uma bactéria contaminante. Quando as bactérias presentes na amostra pertencem ao CMBT, na coloração a partir do MGIT aparecem umas estruturas características em forma de corda (Figura 4).¹⁵



Figura 4- Estrutura em corda do CMBT observada na coloração de Kinyoun a partir de meio MGIT (Adaptado de 3)

Identificação

Na micobacteriologia, o primeiro passo para identificar as bactérias pertencentes ao CMBT é a observação das colónias no meio de LJ e o exame microscópico a partir das culturas. Para realizar a identificação definitiva, é utilizado o Bioline™ TB Ag MPT64, um teste imunocromatográfico que permite detetar o antigénio MPT64, que é libertado pelas bactérias do CMBT.¹⁶

TSA

Quando a bactéria identificada pertence ao CMBT, é necessário realizar o TSA qualitativo para os cinco fármacos de primeira linha: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Para o TSA dos primeiros 4 fármacos são utilizados tubos MGIT e para o TSA da pirazinamida é utilizado o meio BACTEC MGIT™ 960 PZA. Antes de serem utilizados, estes meios são suplementados e depois é adicionado 0,5mL da cultura positiva em meio MGIT e 100µL do respetivo fármaco. Para além destes, tem de existir um controlo positivo para cada meio, no qual não é adicionado qualquer tipo de fármaco. Estes tubos são colocados no BACTEC™ MGIT™ 960, que avalia automaticamente se a micobactéria é suscetível ou

resistente ao antibiótico. Caso se verifique crescimento apenas no controlo, a bactéria é considerada suscetível ao antibiótico. Mas se houver crescimento no controlo e no tubo de TSA, é considerado resistente ao antibiótico.¹⁵ Este último passo permite que o tratamento da doença causada por micobactérias do CMBT seja mais direcionado e eficaz.

Quantiferons

O Liason QuantiFERON[®]-TB Gold Plus é um teste que permite avaliar a exposição do doente ao CMBT, a partir de amostras de sangue colhidas para 4 tubos específicos (controlo, TBI, TB2 e Mit). Os tubos TBI, TB2 e Mit contêm uma mistura de peptídeos, que simulam as proteínas ESAT-6 e CFP-10 e que estimulam os linfócitos T sensibilizados a produzir interferão- γ . Para existir esta estimulação, todos os tubos são incubados durante 16 a 24h a 37°C e com 8% de CO₂. Após a incubação, os tubos são colocados no Liason XL, que utiliza uma técnica de imunoensaio por quimioluminescência para detetar os níveis de interferão- γ . A produção de interferão- γ neste ensaio é característica da exposição ao CMBT.^{4,17} Este teste é utilizado especialmente em indivíduos que vão iniciar uma terapêutica imunossupressora, devido a um transplante ou a uma doença autoimune, indivíduos com HIV (vírus da imunodeficiência humana) e grávidas, porque são grupos que podem desenvolver infeção ativa, caso tenham tido contacto com o CMBT.

5.3. Parasitologia

Os parasitas são organismos que dependem de outro ser para viver, apresentando uma dependência metabólica deste. A sua transmissão pode ocorrer através de consumo de alimentos ou água contaminados, contacto sexual, picada de artrópodes (vetor), penetração cutânea ou transmissão vertical entre mãe e filho.^{4,18}

Como os países em desenvolvimento (tropicais e subtropicais) apresentam condições de higiene precárias (falta de saneamento, consumo de água não tratada...), falta de recursos médicos, elevada densidade populacional e condições ambientais favoráveis aos vetores, estes apresentam uma maior prevalência das doenças parasitárias.¹⁸ No entanto, o aumento das viagens e do uso de antibióticos, as alterações climáticas, que alteram a distribuição geográfica dos vetores, e o aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, têm vindo a contribuir para a distribuição mundial destas infeções. Como tal, o estudo das doenças parasitárias tem vindo a aumentar nos países desenvolvidos.^{4,5,18}

Para realizar o diagnóstico de uma infeção parasitária, o clínico necessita de avaliar a sintomatologia e a história clínica do paciente, incluindo doenças, estado imunitário, viagens

recentes.... Após esta análise, o médico determina qual a amostra que deve ser analisada no laboratório, de acordo com o tipo de infecção parasitária mais provável.⁵

A pesquisa de parasitas pode ser realizada numa grande diversidade de amostras, mas a mais solicitada no HUC é a pesquisa nas fezes. Como os parasitas são eliminados de forma intermitente nas fezes, é aconselhado que sejam colhidas 3 amostras em dias alternados num intervalo máximo de 10 dias para contentores estéreis.^{5,18} Quando estas chegam ao laboratório são sujeitas ao exame macroscópico, que avalia a cor, a consistência (pastosa, sólida, líquida), a presença de sangue e/ou muco e de formas parasitárias visíveis a olho nu, como larvas, ovos ou vermes adultos, ou de fragmentos destas.^{5,18} De seguida, a amostra é sujeita a uma técnica de concentração baseada no método bifásico de Ritchie, utilizando o kit ParasiTrap[®], que permite obter o sedimento fecal, que é observado ao microscópio com a objetiva de 10X e 40X. Com a objetiva de 10X, procuram-se estruturas parasitárias maiores, como ovos, larvas ou seres adultos, de *Ascaris lumbricoides*, *Taenia spp.* e *Trichuris trichiura*, entre outros. Já a objetiva de 40X, permite observar estruturas de menor dimensão, como os quistos e trofozoítos, de por exemplo, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*.^{4,5,18} Para além do exame parasitológico, o HUC apresenta testes imunocromatográficos para deteção de antígenos de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium*, que auxiliam no diagnóstico de infeções intestinais causadas por estes parasitas.

O sangue também é enviado para o laboratório para pesquisa de parasitas, como a *Leishmania spp.*, o *Trypanosoma spp.* e *Plasmodium spp.*. Quando as amostras de sangue chegam ao laboratório é realizado um esfregaço fino para ser corado pela coloração de Giemsa. Este esfregaço permite conservar a morfologia (tamanho, cor, forma, estrutura) das formas parasitárias e por essa razão, a visualização destas ao microscópio com objetiva de imersão de 50X e de 100X, permite identificar o parasita.¹⁸

Quando se trata de um pedido com suspeita de *Plasmodium spp.* é realizado um esfregaço de gota espessa, que permite concentrar a amostra numa área menor e destruir os eritrócitos, o que aumenta a sensibilidade de deteção do parasita. A identificação da espécie em *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium knowlesi* é realizada através do esfregaço fino.¹⁸

5.4. Micologia

A micologia é a área da ciência responsável pelo estudo dos fungos. Os fungos são seres eucariotas, que apresentam uma parede celular, constituída principalmente por quitina, e uma membrana celular, constituída por um lípido semelhante ao colesterol, o ergosterol.^{4,19} Existem 3 tipos de fungos: as leveduras, os fungos filamentosos e os fungos dimórficos. Na

maioria das vezes, os fungos dimórficos apresentam formas diferentes dependendo da temperatura, isto é, à temperatura corporal (37°C) apresenta-se na forma leveduriforme e à temperatura ambiente (~25°C) apresenta-se na forma filamentosa. Existem, no entanto, fungos que apresentam dimorfismo não dependente da temperatura.⁴

Antigamente, a micologia não era uma área com grande significado clínico, porque se considerava que os fungos não eram importantes causadores de infecção. Atualmente, as infecções fúngicas, tanto as nosocomiais como as adquiridas na comunidade, têm vindo a aumentar, devido principalmente ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, que podem ser infetados por fungos oportunistas, isto é, fungos normalmente não patogénicos.⁴

No HUC, a maioria das infecções fúngicas diagnosticadas são causadas por fungos oportunistas em indivíduos imunocomprometidos (transplantados, portadores de HIV, doentes oncológicos...). Mas, existe uma pequena quantidade que é provocada por fungos patogénicos, que são principalmente fungos dimórficos, como o *Histoplasma capsulatum*.

O diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas implica o isolamento e identificação do fungo. Para isso, as amostras biológicas, como amostras respiratórias, sangue, LCR, biópsias, unhas, cabelo, entre outras, são inoculadas no meio SGC2. Posteriormente, as placas são colocadas a incubar numa estufa com humidade, de modo que os meios não sequem, e com O₂, pois nenhum fungo é anaeróbio obrigatório. Em relação à temperatura de incubação, a maioria das placas são incubadas a 37°C, mas se houver suspeita de dermatófitos, são incubadas a 25°C. Já em relação ao tempo de incubação, este varia com o fungo, mas como a maioria dos fungos apresenta um crescimento lento, as placas são incubadas por pelo menos 4 semanas até serem dadas como negativas.⁴

Ao longo do tempo de incubação as placas vão sendo visualizadas para avaliar o crescimento do fungo. Quando se verifica o crescimento de leveduras, estas são identificadas pelo aparelho automático MALDI Biotyper[®], que consegue distinguir leveduras clinicamente relevante, como a *Candida spp.* ou *Cryptococcus neoformans*. Quando há crescimento de fungos filamentosos, estes são identificados tendo em conta as características microscópicas e macroscópicas das colónias e o tempo de crescimento. Nas características macroscópicas da colónia avalia-se a textura, a pigmentação da superfície e do verso, o tipo de micélio, a morfologia, entre outras. Para a avaliação microscópica, numa lâmina é colocado um fragmento de colónia sobre uma gota de azul de lactofenol, que é observada com a objetiva de 10X e de 40X. O azul de lactofenol permite preservar as estruturas e observar a morfologia das hifas e dos esporos, o que auxilia na identificação. O tempo de crescimento, apesar de ajudar na identificação, é uma característica que pode ser afetada pela quantidade de inócuo, e por isso, deve ser avaliada com cuidado.⁴

O fungo identificado nem sempre é um agente infeccioso, podendo ser um contaminante ou um microrganismo da microbiota, e por isso, quando é realizada a identificação é necessário existir uma interligação dos resultados obtidos com a história clínica do doente. No caso de um indivíduo imunocomprometido, esta avaliação tem de ser mais cautelosa, pois um fungo visto normalmente como não patogénico, pode causar infeções graves.

5.5. Serologia

A Serologia permite realizar o diagnóstico de infeções e avaliar o estado de imunidade do doente, através da deteção e quantificação dos anticorpos presentes na amostra.⁵

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas sintetizadas pelo plasmócito quando o organismo de um indivíduo imunologicamente competente entra em contacto com um agente patogénico. Quando temos o primeiro contacto com o agente infeccioso, são produzidas IgM, que caracterizam uma infeção aguda ou recente. Posteriormente, começam a ser produzidas IgG, que caracterizam uma infeção passada ou imunização, e começam a diminuir os níveis de IgM.^{4,5}

Para a realização de testes serológicos podem ser utilizadas diferentes técnicas que têm por base a interação antígeno-anticorpo e são realizados, na maioria das vezes, no soro, podendo ser utilizado também o LCR.⁵ As técnicas usadas no laboratório são:

I. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ELISA é um teste imunoenzimático em que o antígeno específico se encontra adsorvido nas cúpulas de uma microplaca. Quando se adiciona a amostra positiva ao poço, os anticorpos ligam-se ao antígeno, formando um complexo. A este poço é adicionada uma antioglobulina humana marcada com uma enzima, que se liga ao complexo, e um substrato incolor, que por ação enzimática dá origem a um produto corado. A intensidade da cor, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional à concentração de anticorpos da amostra.^{3,5} Este teste é usado, por exemplo, para dosear anticorpos anti-*Leptospira* (IgG e IgM) e anti-*Yersinia enterocolitica* (IgA e IgG).

II. Ensaio de fluorescência enzimática (ELFA)

O ELFA é um teste imunoenzimático semelhante ao ELISA, mas que deteta o imunocomplexo através da adição de uma antiglobulina humana marcada com fosfatase alcalina, que se liga ao complexo, e de um substrato, que quando sofre a reação de hidrólise, emite fluorescência a 450nm (nanômetros). A fluorescência emitida é proporcional à concentração de anticorpos presentes na amostra.²⁰ Esta técnica é usada, por exemplo, para realizar o teste confirmatório de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (IgG e IgM).

III. Imunoensaio por quimioluminescência com micropartículas (CMIA)

No CMIA, a amostra é incubada com micropartículas magnéticas revestidas com antígenos recombinantes específicos, aos quais se ligam os anticorpos de interesse presentes na amostra. De seguida, adiciona-se um anticorpo monoclonal anti-globulina humana ligado a um derivado de isoluminol que se liga aos anticorpos de interesse. Depois da incubação, adiciona-se os reagentes que vão induzir uma reação de quimioluminescência, existindo a emissão de luz. O sinal luminoso depende da quantidade de imunocomplexo e indica a concentração de anticorpos presente na amostra.²¹ Este método é o mais usado no HUC e permite, por exemplo, dosar os anticorpos anti-*Chlamydia pneumoniae* (IgM e IgG) e anti-*Toxoplasma gondii* (IgG e IgM).

IV. Imunofluorescência indireta (IFI)

A IFI utiliza uma lâmina que tem adsorvido na sua superfície um antígeno específico e purificado. Se a amostra for positiva, os anticorpos ligam-se aos antígenos presentes na lâmina, formando o complexo antígeno-anticorpo. Depois adiciona-se um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com fluoresceína que se liga ao complexo. Ao observar a lâmina num microscópio de fluorescência, podemos observar a fluorescência do complexo e realizar uma análise qualitativa e semi-quantitativa, em que a intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à concentração de anticorpo na amostra.^{3,5} No HUC, esta técnica é utilizada para detetar anticorpos IgG anti-*Rickettsia conorii* e anti-*Coxiella burnetti*.

V. Rosa de Bengala

O Rosa de Bengala é um teste qualitativo que permite detetar rapidamente anticorpos IgM e IgG anti-*Brucella abortus* em soro ou em LCR, Este teste baseia-se numa reação de aglutinação em placa, entre a amostra e uma suspensão tamponada de *Brucella abortus* 99 inativada e corada com rosa de bengala. Se existir aglutinação, a amostra é positiva.⁴

VI. Rapid Plasma Reagin (RPR)

O RPR é um teste de aglutinação em placa que permite detetar reagentes, que são anticorpos libertados quando células infetadas por *Treponema pallidum* são destruídas. Como este teste não deteta anticorpos anti-*Treponema pallidum* é considerado um teste não treponémico. Para detetar as reagentes, utiliza-se um complexo de cardiolipina, lecitina e colesterol com carvão ativado (reagente), que funciona como antigénio. Caso a amostra seja positiva, ao juntá-la ou a uma das suas diluições com o reagente, existe uma reação de aglutinação visível a olho nu.⁵

Para além de qualitativo, este teste é semi-quantitativo porque permite saber o título de anticorpos do paciente, que corresponde à maior diluição em que se verifica aglutinação.

Este teste, para além de ser usado para diagnóstico, que tem de ser confirmado com um teste treponémico, também é usado para avaliar o tratamento de pacientes diagnosticados com sífilis. Tal só é possível, porque os níveis de reagentes vão diminuindo com a terapêutica.

VII. Treponema Passive Particle Agglutination (TP-PA)

O TP-PA é um teste de aglutinação em microplaca que permite detetar a presença de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, sendo por essa razão, um teste treponémico.^{3,5}

Inicialmente realizam-se diluições sucessivas da amostra nos poços. A cada um deles adiciona-se uma suspensão de partículas de gelatina sensibilizadas com o antigénio purificado de *Treponema pallidum*, com exceção dos poços de controlo negativo (coluna NS na Figura 5), em que se adicionam partículas não sensibilizadas.³ Depois, a microplaca é incubada 2 a 3 horas no escuro e realiza-se a leitura dos resultados.

Este é um teste qualitativo e semi-quantitativo, porque permite saber o título de anticorpos, que corresponde à maior diluição em que há aglutinação. Para ser considerado negativo, todos os poços de teste devem apresentar as partículas concentradas no centro do poço (observado na Figura 5). Uma amostra positiva apresenta poços em que se verifica aglutinação em forma de anel (observado na Figura 5). Este teste não é utilizado para avaliar o tratamento de doentes com sífilis, nem avaliar reinfeções, porque os títulos dos anticorpos anti-*Treponema pallidum* permanecem altos durante e após a terapêutica.⁵

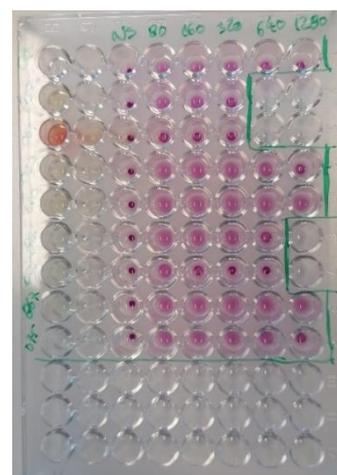


Figura 5- TP-PA. (Imagem do CHUC)

No HUC, uma das serologias mais pedidas é para *Treponema pallidum*, uma bactéria espiralada responsável pela sífilis. Quando uma amostra de soro chega ao laboratório com suspeita de sífilis, é realizado um teste treponêmico de rastreio de anticorpos IgG e IgM através de CMIA, no Alinity i, e caso seja positivo, realiza-se o RPR com titulação. Quando este é reativo, tem de existir a confirmação por um teste treponêmico, em que se detetam IgM por CMIA, no Virclia. Se o resultado for positivo, o paciente apresenta uma infecção ativa. Caso o RPR com titulação seja não reativo, é realizado o TP-PA. Se este der positivo, o doente apresenta uma sífilis tratada, porque mantêm os anticorpos anti-*Treponema* e perde as reaginas. Mas se o TP-PA der negativo, significa que o rastreio inicial deu um falso positivo.

Existem grupos específicos, como as grávidas e os doentes sujeitos a transplantes, que realizam serologias como forma preventiva. No caso das grávidas, é realizado o rastreio de infecções por *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, Citomegalovírus, Rubéola e HIV-1/2, pois são infecções que podem ter graves consequências para o feto.

6. Setor de Imunologia

A Imunologia é a área da ciência que estuda o sistema imunitário e as doenças associadas a este, sendo extremamente importante no diagnóstico de doenças autoimunes, alergias, imunodeficiências e gamopatias monoclonais, entre outras.²² No SPC-CHUC, o setor de Imunologia encontra-se dividido em 2 sub-setores: a Autoimunidade e a Imunoalergologia. Nestes sub-setores, a amostra mais utilizada é o soro, mas também podem ser utilizadas amostras de urina, fezes e LCR.

A Autoimunidade dedica-se ao diagnóstico e monitorização de doenças autoimunes, isto é, doenças em que o sistema imunitário começa a produzir anticorpos contra o próprio organismo.²² Para isso, neste setor são utilizadas metodologias que permitem detetar autoanticorpos, como a IFI, o ELISA, o radioimunoensaio (RIA), o imunoensaio fluoroenzimático (FEIA), o CLIA e o immunoblotting. Na Tabela V encontram-se alguns exemplos de autoanticorpos detetados pelas diferentes metodologias.

Tabela V - Metodologias e exemplos de parâmetros avaliados em Autoimunidade

Metodologia	Parâmetros avaliados
Imunofluorescência indireta (IFI)	Anticorpos antinucleares e citoplasmáticos (ANA); Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA); Anticorpos anti-mitocôndria (AMA).
Quimioluminescência (CLIA)	Anticorpos anti-antígenos nucleares extraídos (ENA7); Anticorpos anti-membrana basal glomerular; Anticorpos anti-cardiolipinas (IgG e IGM).
Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)	Anticorpos anti-mieloperoxidase; Anticorpos anti-proteinase 3; Calprotectina.
ELISA	Anticorpos anti-histonas; Anticorpos anti-fator intrínseco.
Immunoblotting	Anticorpos para estudo de função hepática; Anticorpos para estudo de miosites.
Radioimunoensaio (RIA)	Anticorpos anti-dsDNA; Anticorpos anti-insulina.

Na Imunoalergologia são realizadas diversas análises, nomeadamente o doseamento de imunoglobulinas, cadeias leves e proteínas do complemento por nefelometria ou turbidimetria. Para além disso, são realizados proteinogramas, que permitem detetar alterações a nível das proteínas séricas. Quando surgem alterações no perfil proteico é realizada uma imunofixação, com o objetivo de caracterizar a imunoglobulina que está alterada, identificando o tipo de cadeia pesada (A, G, M, D ou E) e de cadeia leve (lambda ou kappa), de modo a identificar a gamapatia. Para além de ser realizada no soro, a imunofixação pode ser realizada para caracterização das proteínas da urina. Por fim, neste sub-setor é realizada a deteção de IgE e IgG específica no soro para o estudo de alergias pelo método de FEIA e é avaliada a elastase fecal por ELISA, para avaliar a função pancreática exócrina. Na Tabela VI encontram-se alguns exemplos dos parâmetros analisados pelas diferentes metodologias.

Tabela VI – Metodologias e exemplos de parâmetros avaliados em Imunoalergologia

Metodologia	Parâmetros avaliados
Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)	IgE específica e IgG específica para alérgenos; Trypticase.
Nefelometria	Fator reumatoide; Subclasses IgG; Haptoglobina; Pré-albumina; Cadeias leves na urina; Cistatina C; Apolipoproteína E;
Turbidimetria	Cadeias leves kappa e lambda livres; Subclasses IgA1 e IgA2; Hevylite IgA, IgG e IgM; Complemento CH50.
ELISA	Elastase fecal

7. Setor de Bioquímica Clínica

A Bioquímica Clínica é uma área que envolve o estudo de diversos parâmetros que permitem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças. A amostra mais usada neste setor é o soro, que é a porção sanguínea líquida obtida após a formação do coágulo, e a urina. Para obter o soro, o sangue do paciente é colhido para um tubo com gel separador, que após retração do coágulo é centrifugado a 3000 RPM durante 15 minutos. Existem outras amostras, como o sangue total, o LCR e outros líquidos biológicos, em que podem ser determinados alguns parâmetros bioquímicos, embora sejam menos comuns.^{23,24}

7.1. Aparelhos e suas metodologias

A maioria das análises bioquímicas são realizadas nos auto-analizadores da Abbott, os Alinity, que se encontram dispostos em cadeia no Corelab e que serão descritos mais detalhadamente de seguida. Existem outros parâmetros como a hemoglobina glicada, o sangue oculto nas fezes, a sumária e sedimento urinário que são determinados noutros aparelhos existentes noutras salas de trabalho, que serão abordados posteriormente.

Alinity c (Abbott)

O Alinity c é o aparelho que permite determinar a maioria dos parâmetros bioquímicos analisados e para isso, utiliza métodos de espectrofotometria, potenciometria e turbidimetria.

A espectrofotometria é um método que consiste na medição da absorvância da amostra, a quantidade de luz absorvida pela amostra, quando esta é incidida por um feixe de luz de comprimento de onda conhecido. Utilizando a lei de Beer-Lambert é possível determinar a concentração do analito em estudo, que é diretamente proporcional à absorvância da luz.²⁴

A potenciometria é uma técnica que permite medir a diferença de potencial entre dois elétrodos seletivos de iões, o elétrodo de referência e o de medição, numa célula eletroquímica. O elétrodo de medição tem a capacidade de desenvolver um potencial de acordo com a concentração ou atividade do ião na amostra. Este potencial é comparado com o potencial fixo fornecido pelo elétrodo de referência e utilizando a equação de Nernst é possível determinar a concentração do ião na amostra.²⁴

A turbidimetria é uma técnica que permite medir a luz transmitida, resultante da interação da luz com um complexo antígeno-anticorpo formado na amostra. A luz transmitida é proporcional à concentração do analito presente na amostra.^{22,24}

Alinity i (Abbott)

O Alinity i permite determinar alguns parâmetros bioquímicos através de imunoenaios por quimioluminescência com micropartículas (CMIA). As micropartículas magnéticas estão revestidas com moléculas que têm a capacidade de se ligar ao analito presente na amostra, formando um imunocomplexo. Posteriormente, é adicionado um conjugado ligado a um composto quimioluminescente, o acridínio, que se liga ao imunocomplexo. Por fim, são adicionados reagentes que reagem quimicamente com o acridínio, existindo emissão de luz, que é proporcional à quantidade de analito presente na amostra.^{24,25}

Na Tabela VII são referidas exemplos das análises realizadas em cada aparelho e qual a metodologia utilizada.

Tabela VII - Exemplos de análises realizadas nos Alinity e respectivas metodologias.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros
Alinity c	Espetrofotometria	Glicose, Triglicerídeos, Colesterol total, LDH, HDL, Creatinina, Azoto ureico, Ácido úrico, AST, ALT, GGT, FA, Bilirrubina Total e Direta, Albumina, Proteínas totais, CK, LDH.
	Turbidimetria	PCR, ApoB, Lp(a), Proteinúria, Microalbuminúria.
	Potenciometria	Ionograma (Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺).
Alinity i	CMIA	Mioglobina, NT-proBNP, BNP, hscTnl, Procalcitonina, Vitamina B12, Análises serológicas, Fármacos imunossupressores.

7.2. Parâmetros bioquímicos

Como o setor de bioquímica realiza uma grande variedade de análises, seria impossível referir todos os parâmetros analisados neste setor e por essa razão, de seguida, abordo alguns dos parâmetros mais realizados na rotina laboratorial.

I. Avaliação da glicémia

A principal fonte de energia do organismo é a glicose, que pode ser obtida através da dieta ou ser produzida a nível hepático. De modo a controlar os seus níveis, quando existe um aumento de glicose no sangue, o pâncreas produz insulina, que estimula a captação de glicose pelos tecidos dependentes desta, como o tecido esquelético. Para além disso, a insulina ativa vias de armazenamento de glicose e inibe vias de degradação. Quando os níveis de glicose diminuem, o pâncreas liberta glucagon, que atua de forma inversa.²⁴

A diabetes mellitus é uma doença em que os níveis de glicose no sangue permanecem elevados (hiperglicemia), devido a alterações na ação ou na quantidade de insulina. Esta doença pode ser classificada em diabetes tipo 1, tipo 2, gestacional ou outro tipo de diabetes. Na diabetes tipo 1 existe a destruição das células β dos ilhéus de Langerhans, que são as células produtoras de insulina, e por isso, existe uma insulinopenia absoluta. Na diabetes tipo 2 (tipo de diabetes mais frequente), existe uma resistência dos tecidos à ação da insulina e as células β não conseguem compensar essa resistência. A diabetes gestacional é o tipo de diabetes que pode ser desenvolvido durante a gravidez.^{22,24}

Segundo as normas da Direção Geral de Saúde, o diagnóstico de diabetes é feito quando:

- Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dl; ou
- Glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl, no caso de existir sintomas típicos de diabetes; ou
- Glicémia ≥ 200 mg/dl às 2h na prova de tolerância à glucose oral com 75g de glucose; ou
- Hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$.²⁶

Por essa razão, o doseamento de glicose e de hemoglobina glicada são parâmetros importantes para o diagnóstico e para a monitorização de doentes diabéticos.

Glicose

O doseamento da glicose é um dos parâmetros mais solicitados no laboratório e pode ser realizado em amostras de soro, urina e LCR. Na maioria das vezes, a amostra utilizada é o soro, que deve ser colhido em jejum, pois a ingestão de alimentos, pode levar a uma falsa elevação dos seus valores. Este parâmetro é um dos primeiros a ser solicitado quando o clínico suspeita de diabetes, mas também pode ser solicitado quando este desconfia de hipoglicémia, pois ambos os casos têm consequências para o doente e devem ser tratados. Apesar da hipoglicemia ser menos frequente, esta pode acontecer devido a várias patologias, como o insulinoma, o hipotireoidismo e a insulinoaterapia excessiva.^{22,24}

O doseamento da glicose na urina pode ser realizado para despiste e controlo da diabetes, pois indivíduos com hiperglicemia, apresentam glicose na urina, mas também pode ser usado para descartar danos nos túbulos renais. A determinação da glicose no LCR é importante no diagnóstico de infeções do SNC, pois os microrganismos consomem glicose, existindo uma diminuição dos seus níveis.

O doseamento de glicose baseia-se numa reação enzimática usando a hexocinase e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A glicose, na presença de ATP, é fosforilada pela hexocinase, dando origem a glicose-6-fosfato. Esta é oxidada pela G6PD, dando origem a 6-

fosfogluconato, e em simultâneo e na mesma proporção, o NAD é reduzido a NADH. Como o NADH absorve luz a 340nm, pode ser determinada a absorvância, que permite obter a concentração de NADH, que é igual à de glicose.²⁴

Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada (HbA1c) é utilizada principalmente para monitorar os níveis de glicémia nos pacientes diabéticos, apesar de também poder ser usada para diagnóstico. Tal acontece, porque se um paciente diabético realizar o tratamento com insulina antes da colheita de sangue, os níveis de glicémia estarão normais, mas a HbA1c refletirá os últimos 3 meses, podendo existir o seguimento mais correto do paciente.²²

A HbA1c resulta de uma reação não enzimática irreversível entre a glicose que circula no sangue e as cadeias β da hemoglobina e reflete a glicose plasmática média durante os 2 a 4 meses anteriores à colheita.²² Esta análise pode ser realizada a partir de um tubo de sangue com K₃-EDTA, colhido a qualquer hora do dia, no aparelho D-100 (Bio-rad), que utiliza uma técnica de cromatografia líquida de alta eficácia. No caso de haver resultados anómalos, como deteção de presença de variantes de hemoglobina, é realizada uma análise confirmatória por eletroforese capilar, no MINICAP (Sebia).

II. Avaliação do perfil lipídico

Os lípidos são um conjunto de compostos solúveis em compostos orgânicos, mas quase insolúveis em água e que apresentam diferentes funções essenciais à vida, entre as quais, ser fonte de energia, auxiliar na digestão, pertencer à estrutura das células e servir de produto para a síntese de hormonas.²⁴

Como são insolúveis em água, os lípidos circulam no plasma na forma de lipoproteínas, ou ligados à albumina. As lipoproteínas são constituídas por lípidos, como o colesterol, os triglicerídeos e os fosfolípidos, e por apolipoproteínas. Estas podem ser divididas em 4 grupos de acordo com a sua densidade e tamanho: quilomicron, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Para além das diferenças de tamanho e densidade, estas lipoproteínas apresentam diferentes apolipoproteínas, que lhes permitem interagir com diferentes enzimas e recetores celulares, de acordo com o seu destino.^{22,24}

Alterações no metabolismo das lipoproteínas, podem conduzir ao desenvolvimento de patologias, como a dislipidemia (aumento anómalo dos níveis de lípidos no sangue) e a aterosclerose (estado inflamatório crónico provocado pela acumulação de LDL no interior das artérias).^{24,27} A aterosclerose aumenta a probabilidade de desenvolver doenças

cardiovasculares, que colocam em risco a vida do doente. Por essa razão, a nível laboratorial é necessário realizar o estudo do perfil lipídico avaliando o colesterol total, o colesterol-HDL, o colesterol-LDL e os triglicéridos no soro.

Colesterol total

O colesterol é uma molécula essencial para o organismo, presente na membrana celular dos mamíferos e precursor de hormonas esteroides e vitamina D. Esta molécula é obtida em pequena porção na dieta e é sintetizada a nível hepático e geralmente, estes dois mecanismos atuam de forma inversa, o que permite que os níveis de colesterol se mantenham constantes no sangue.^{22,24}

O doseamento do colesterol total inclui o doseamento do colesterol livre e do colesterol esterificado. Em primeiro lugar, o colesterol esterificado é hidrolisado pela colesterol esterase, de modo a obter colesterol livre. A seguir, todo o colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase, formando peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Quando o H_2O_2 reage com a 4-aminoantipirina e um fenol, dá origem à quinoneimina, um cromóforo, que é detetado por espectrofotometria a 500nm. A quantidade desta é proporcional à de colesterol total.²⁴

O colesterol pode ser determinado para avaliar a função hepática, a função biliar, entre outras, mas este é principalmente determinado para avaliar o risco de aterosclerose, que aumenta quando existe um aumento dos seus níveis. Este aumento pode ser devido a fatores ambientais ou devido a fatores genéticos.²⁴

Colesterol-HDL

As HDL são lipoproteínas que realizam o transporte reverso do colesterol, ou seja, removem o excesso de colesterol dos tecidos e transportam-no para o fígado, onde vai existir a sua excreção, o que contribui para a manutenção dos níveis de colesterol. Para além disso, as HDL impedem a formação de placas aterogénicas, devido às suas capacidades anti-oxidantes, anti-inflamatórias e anti-trombóticas. Desta forma, as HDL são consideradas anti-aterogénicas e cardioprotetoras, o que significa que estas devem ser medidas de modo a avaliar o risco aterogénico. Para que este risco seja baixo, os níveis de colesterol-HDL devem ser elevados. Caso os níveis sejam baixos, existe um aumento do risco, sobretudo quando associado a triglicéridos elevados.^{22,24}

Para realizar a quantificação do colesterol-HDL existe o consumo do colesterol não-HDL e posteriormente, a amostra é sujeita a um detergente, que tem a capacidade de solubilizar o colesterol-HDL, à colesterol esterase e a uma molécula cromogénica, que permite que este apresente cor, que é medida por espectrofotometria.²⁸

Colesterol-LDL

As VLDL ricas em triglicerídeos são sintetizadas a nível hepático e libertadas na corrente sanguínea, onde vão sofrer a ação de enzimas lipolíticas, que vão degradar os triglicerídeos presentes nestas, dando origem às LDL. As LDL são as principais lipoproteínas responsáveis pelo transporte de colesterol do fígado para os tecidos periféricos e o seu aumento está associado a um maior risco aterosclerótico.^{22,24} Para realizar a quantificação do colesterol-LDL é utilizado um método similar ao realizado para o doseamento do colesterol-HDL.²⁹

Triglicerídeos

Os triglicerídeos são lípidos constituídos por uma molécula de glicerol e 3 ácidos gordos. Estes podem ser obtidos através da dieta ou através da síntese no fígado, sendo transportados, respetivamente, pelos quilomicrons e pelas VLDLs. Como após a refeição, os níveis de quilomicrons aumentam, é necessário que este parâmetro seja avaliado em jejum.²⁴

O primeiro passo no doseamento de triglicerídeos é a sua hidrólise a ácidos gordos livres e glicerol, pela lipase. Posteriormente, o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato, pela glicerocinase, que depois é convertido em H_2O_2 , pelo glicerofosfato oxidase. O H_2O_2 reage com a 4-aminoantipirina e um fenol, dando origem a um cromóforo, que é detetado por espectrofotometria e é proporcional à quantidade de triglicerídeos.²⁴

O aumento dos níveis de triglicerídeos pode ser devido a fatores ambientais (obesidade, dieta rica em hidratos de carbono, álcool...), a fatores genético ou ser secundário a um conjunto de doenças, como a nefrose, a diabetes mellitus e distúrbios endócrinos e constitui um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose.²⁴

III. Avaliação da função renal

O rim é constituído por milhares de nefrónios, que são a sua unidade funcional. Cada nefrónio é constituído pelo glomérulo, pela ansa de Henle, pelos túbulos proximal e distal e pelo tubo coletor. Como a principal função do rim é a manutenção da homeostase da água e dos eletrólitos, regulando a composição e o volume do plasma, é necessário existirem trocas de fluidos e eletrólitos entre o sangue e o interior dos nefrónios, e por essa razão, estes são extremamente irrigados por arteríolas e redes de capilares. Através de fenómenos de filtração, secreção e reabsorção, é formada a urina, que contem produtos de excreção, como o azoto ureico e a creatinina. Produtos de maior tamanho, como a glicose e as proteínas, não são filtradas a nível do glomérulo e por essa razão, normalmente não aparecem na urina. Para além disso, os rins também são responsáveis pela síntese de renina, eritropoietina e calcitriol (vitamina D ativada).^{22,23,30}

Para avaliar a função renal são avaliados biomarcadores, como a creatinina e azoto ureico no soro, são calculadas a taxa de filtração glomerular (TFG) e clearance da creatinina e é realizada a sumária e o sedimento urinário. Estes biomarcadores permitem diagnosticar a doença renal, avaliar a sua evolução e acompanhar o tratamento.

Azoto ureico

A amónia, sintetizada devido ao catabolismo das proteínas e dos aminoácidos, é convertida em azoto ureico pelas enzimas do ciclo da ureia, existentes apenas no fígado. Quando o azoto ureico (ureia) é sintetizado, este é maioritariamente eliminado a nível renal, por filtração glomerular e por isso, caso exista uma doença renal, a eliminação diminui e a concentração de ureia aumenta a nível sanguíneo. Para além disso, o aumento do aporte de proteína na dieta, a maior taxa de degradação proteica, a diminuição da perfusão renal, entre outros, pode levar ao aumento da ureia e por isso, esta não é específica da doença renal e deve ser analisada juntamente com a creatinina.^{24,30}

Para determinar a concentração de ureia, primeiro, a urease hidrolisa a ureia, dando origem a iões de amónia e CO_2 . A amónia reage com o 2-cetoglutarato, devido à ação do glutamato desidrogenase, o que provoca a oxidação do NADH a NAD^+ . Com o consumo de NADH, há uma diminuição da absorvância a 340nm, que é proporcional à concentração de ureia existente na amostra.²⁴

Creatinina

A creatinina é o produto final do metabolismo da fosfocreatina e da creatina a nível do músculo esquelético e os seus níveis estão relacionados com a massa muscular do indivíduo. Tal como a ureia, a creatinina é eliminada a nível renal, e por isso, os seus níveis aumentam quando existe uma doença renal, mas como esta não é afetada pela dieta, idade, sexo e exercício, esta é considerada um melhor indicador de doença renal.^{24,30}

Como esta é filtrada a nível glomerular, a concentração sérica de creatinina é um parâmetro usualmente usado para avaliar a TFG, sendo que um aumento dos níveis de creatinina no soro, estão associados a uma diminuição da TFG. Quando há uma diminuição leve da TFG, esta pode não ser refletida na creatinina sérica e por isso, um valor normal de creatinina, não implica uma TFG normal. Logo, a creatinina sérica não é suficientemente sensível, devendo ser calculada a clearance da creatinina.²⁴

A clearance de creatinina é a quantidade de creatinina eliminada pelo rim por unidade de tempo e permite avaliar corretamente a TFG.²² Para calcular a clearance da creatinina, é necessário dosear a creatinina no soro e na urina de 24h e é utilizada a fórmula seguinte²²:

$$\text{Clearance da creatinina} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = \frac{[\text{creatinina na urina}]}{[\text{creatinina no soro}]} \times \text{Volume da urina (24h)}$$

Apesar de a clearance ser mais sensível para a avaliação da TFG, a colheita de amostras de urina de 24h é um procedimento inconveniente para a maioria dos doentes e impreciso, pois a colheita pode não ser realizada corretamente. Como tal, o cálculo da TFG, tendo em conta a idade, o sexo, o peso e a creatinina sérica, tem vindo a substituir a avaliação da TFG pela clearance da creatinina.²² Esta pode ser calculada utilizando a fórmula seguinte²²:

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

Para todos estes parâmetros é essencial a determinação da concentração da creatinina no soro e/ou na urina. A creatinina reage com o picrato, em meio básico, dando origem a um complexo laranja. Este absorve a 500nm e por isso, há um aumento da absorvância, que é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra.^{30,31}

Análise da urina

A análise de urina é um exame realizado, na maioria das vezes, numa amostra de urina aleatória, mas o recomendado é a análise do jato intermédio da 1ª urina da manhã. Este exame inclui a avaliação físico-química (sumária) da urina e a observação do sedimento urinário. Com esta análise, é possível monitorizar várias patologias renais.³²

A sumária de urina é realizada no aparelho UC-MAX (Menarini), um analisador automático que tem a capacidade de avaliar 3 parâmetros físicos (cor, densidade e turvação) através do módulo PMC (célula de medição física) e 10 parâmetros químicos (pH, glicose, proteínas, corpos cetónicos, nitritos, bilirrubina, urobilinogénio, sangue, leucócitos e ácido ascórbico). Cada um destes parâmetros apresentam um significado clínico, quando presentes, que está especificado na Tabela VIII.

Tabela VIII - Parâmetros analisados na sumária de urina e respetivo significado clínico

Parâmetros	Significado clínico
Coloração	Normalmente, a urina é amarela, mas a cor desta pode alterar-se devido à dieta ou devido à presença de certas substâncias na urina. ³²
Densidade	A densidade mede a concentração das partículas na urina. Esta pode estar diminuída quando o rim tem dificuldade em concentrar a urina. ³²
Turvação	Quando a urina está turva, pode ser indicativo de patologia, mas a presença de muco pode causar turbidez não patológica. ³²
pH	O pH indica a quantidade de ácido na urina, estando associado à capacidade de o rim manter o equilíbrio ácido-base. ³²
Glicose	Quando há hiperglicemia ou a reabsorção tubular falha, existe glicosúria.
Proteínas	O aparecimento de proteína na urina pode ter diversas origens, nomeadamente, lesão glomerular e/ou tubular, excesso de proteína no sangue ou dano ou inflamação do trato urinário inferior. ³²
Corpos cetónicos	Podem estar presentes em casos de cetoacidose metabólica, uma complicação que pode ocorrer na diabetes tipo I. ³²
Nitritos	Os nitritos resultam da redução dos nitratos por algumas bactérias, e por isso, podem ser indicativos de uma ITU. ³²
Bilirrubina	A presença de bilirrubina na urina está associada a lesão hepática, obstrução biliar ou hemólise. ³²
Urobilinogénio	O urobilinogénio é sintetizado a partir da bilirrubina e quando aparece na urina pode indicar lesão hepática e hemólise. ³²
Sangue	A hematúria pode ser originada por ITU, cálculos renais, neoplasias ou fármacos, mas como na tira é detetada hemoglobina, esta deve ser confirmada no sedimento urinário. ³²
Leucócitos	A presença de leucócitos sugere uma ITU. ³²
Ácido ascórbico	A presença de ácido ascórbico pode interferir nalguns parâmetros, como a glicose.

Para além da sumária, é realizado o sedimento urinário no sediMAX (Menarini), que está acoplado ao UC-MAX. Este tem a capacidade de tirar fotografias a 15 campos microscópicos diferentes por amostra, após esta ter sido centrifugada. Estas imagens são enviadas para um programa informático, juntamente com as informações da sumária. Nestas imagens avalia-se a presença de eritrócitos, de leucócitos, de células epiteliais, de muco, de microrganismos (bactérias, leveduras e hifas), de cilindros (hialinos, hialino-granulosos e granulosos), de cristais (ácido úrico, oxalato de cálcio, fosfato de cálcio...) e de células do epitélio de transição.³³ Para além de avaliar a presença de determinado elemento, é também necessário fornecer uma avaliação quantitativa, apresentando o resultado em número de elementos por campo.

Tabela IX - Elementos observados no sedimento urinário e respectivo significado clínico

Elementos	Significado clínico
Leucócitos	A presença de leucócitos geralmente ocorre quando existe ITU, mas pode também estar associada a glomerulonefrite, doença renal poliquística, urolitíase, entre outras. Nas mulheres, estes podem aparecer devido a contaminação com secreções vaginais. ³³
Eritrócitos	As principais causas de hematúria isomórfica (eritrócitos todos iguais e com contornos regulares) são doenças urológicas e ITU. Mas, quando a hematúria é causada por uma doença glomerular, os eritrócitos são dimórficos (com contornos irregulares e diferentes entre si). ³³
Células epiteliais	São células de descamação da vagina ou da uretra e o aparecimento em grande quantidade está associado a más colheitas. ³³
Células do epitélio de transição	São células do trato urinário superior, que quando aparecem podem ser indicativos de lesão no trato urinário. ³³
Cilindros	Cilindros hialinos são encontrados em pacientes com glomerulonefrite. Cilindros granulados são sugestivos de lesão renal ou patologia tubular. ³³
Cristais	Os cristais são compostos por produtos metabólicos e são identificados de acordo com a morfologia do cristal e o pH urinário. ³³
Microrganismos	Microrganismos podem ser sugestivos de ITU ou devido a má colheita. ³³

IV. Avaliação do equilíbrio hidro-eletrolítico

Os eletrólitos são átomos ou moléculas carregadas (iões) que se encontram distribuídos no organismo e que têm como principal função, regular a distribuição da água entre o espaço extracelular e intracelular e a pressão osmótica. Para além disso, são essenciais na manutenção do pH, na manutenção da função muscular e cardíaca, em reações oxidação-redução e são cofatores de enzimas. Como tal, alterações no nível destes compostos podem colocar em risco a vida dos pacientes e ocorrem quando o organismo deixa de ter capacidade de regular a água e os eletrólitos.^{24,30} Por essa razão é essencial avaliar laboratorialmente o equilíbrio hidro-eletrolítico, através do ionograma, que permite dosear o sódio (Na^+), o potássio (K^+) e o cloreto (Cl^-) no soro, e é calculada a osmolalidade.

Ionograma

O sódio é o catião mais abundante do espaço extracelular, apresentando um papel fundamental na manutenção da pressão osmótica do plasma e consequentemente, na manutenção do volume sanguíneo.^{24,30} Este é obtido na alimentação e é excretado principalmente pelos rins, que apresentam um papel fundamental na regulação dos níveis de Na^+ e de água, reabsorvendo e excretando o Na^+ , de acordo com as necessidades do organismo. Para isso, os rins são regulados pela aldosterona, que é libertada quando é necessário reter Na^+ , estimulando a reabsorção deste, e pela ADH (hormona anti-diurética), que estimula a reabsorção de água.³⁰

A hiponatremia (diminuição da concentração sérica de Na^+) pode dever-se a perdas de Na^+ , como em situações de vômitos e diarreia persistente, doença renal e queimaduras, ou ao excesso de água, que pode acontecer devido à liberação inapropriada da ADH. Quando os doentes apresentam níveis elevados de proteínas ou lípidos, pode estabelecer-se uma pseudo-hiponatremia. Nestes casos, o Na^+ encontra-se distribuído num menor volume de plasma, porque as proteínas e os lípidos ocupam uma proporção maior deste. Mesmo que os níveis de Na^+ sejam normais nessa fração, como na maioria dos métodos se tem em conta todo o volume de plasma, este encontra-se diminuído.^{22,30}

A hipernatremia (aumento da concentração sérica de Na^+) é menos comum e pode dever-se a excesso de Na^+ , que acontece na síndrome de Cushing, ou a perda de água, como em casos de desidratação severa.^{22,30}

O cloreto é o anião mais abundante no espaço extracelular e apresenta um papel importante na manutenção da pressão osmótica, da homeostase da água e do equilíbrio ácido-base. Os níveis séricos de Cl^- são regulados pelo rim, que tem a capacidade de o eliminar ou reter de acordo com as necessidades do organismo, utilizando os mesmos mecanismos usados para o Na^+ . Por esta razão, os distúrbios que causam alterações dos níveis de Na^+ , são acompanhados por alterações iguais dos níveis de Cl^- . Para além destas, a acidose e a alcalose metabólica podem causar alterações dos níveis de Cl^- , porque existe, respetivamente, uma diminuição e um aumento dos níveis de bicarbonato, que faz variar inversamente o Cl^- , de modo a manter a neutralidade elétrica.³⁰

O potássio é o principal catião intracelular e desempenha um papel essencial na manutenção do potencial de membrana que está envolvido na contração muscular. O K^+ é obtido pela dieta e regulado, de acordo com as necessidades, pelo rim. Quando é libertada aldosterona, esta atua a nível dos rins, estimulando a secreção de K^+ .^{22,30}

A hipercaliémia (aumento da concentração sérica de K^+) pode acontecer quando a eliminação é menor que a retenção, nomeadamente em situações de lesão celular, nefropatia, desidratação, hemólise grave, hipoaldosteronismo, entre outros. Quando existe hemólise in vitro, trombocitose ou leucocitose, pode existir um aumento falso de K^+ (pseudo-hipercaliémia).^{22,30}

A hipocaliémia (diminuição da concentração sérica de K^+) pode acontecer quando há uma baixa ingestão de K^+ ou aumento da perda, devido a vômitos, diarreia, uso de diuréticos, hiperaldosteronismo, perda renal, entre outros.^{22,30}

Como já foi referido, a determinação das concentrações destes iões baseia-se na potenciometria, utilizando eléctrodos seletivos para cada um dos iões.

Osmolalidade

A osmolalidade é a concentração total de soluto por quilograma de água, e por isso, reflete o equilíbrio hidro-eletrolítico. As partículas que contribuem mais para a osmolalidade plasmática são o Na⁺, K⁺, Cl⁻, a glicose e a ureia. Quando os níveis destes solutos aumentam, a osmolalidade aumenta, o que estimula a sede e a secreção de ADH pelo hipotálamo, provocando uma diminuição da osmolalidade plasmática e um aumento da osmolalidade urinária.^{22,24,30}

No HUC, a osmolalidade plasmática é calculada utilizando a seguinte expressão²²:

$$Osm \left(\frac{mOsm}{kg} \right) = (2 \times [Na^+]) + (1,4 \times [glicose]) + (1,2 \times [ureia])$$

A causa mais comum de hiperosmolalidade plasmática é a diminuição da secreção de ADH no diabetes insipidus, o que diminui a reabsorção de água. Por outro lado, a síndrome inapropriada de libertação da ADH é a causa mais comum de hiposmolalidade plasmática.³⁰

V. Avaliação hepática

O fígado é o maior órgão do sistema gastrointestinal e tem diversas funções, entre as quais, o metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e proteínas, a produção de biliar, o metabolismo da bilirrubina, a síntese de proteínas, como a albumina, proteínas de fase aguda e fatores de coagulação, e a desintoxicação do organismo, através da biotransformação de moléculas tóxicas que permite a sua eliminação.^{22,30}

A avaliação hepática inclui o estudo da lesão hepatocelular, da colestase e da função hepática através da medição de parâmetros como a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST), a gama-glutamilttransferase (GGT), a fosfatase alcalina (FA), a lactato desidrogenase (LDH), a bilirrubina, as proteínas totais e a albumina.

Aminotransferases (AST e ALT)

A AST e a ALT são aminotransferases que catalisam a conversão de um aminoácido específico num oxoácido por transferência do grupo amino.

A AST está presente nas células do coração, do fígado, dos rins, do músculo esquelético, entre outros, e por isso, o seu aumento no soro pode indicar lesão hepatocelular, muscular ou outra. Já a ALT, apesar de estar presente noutros órgãos, é encontrada principalmente nas células do fígado (nos hepatócitos). tendo o seu aumento uma maior especificidade para a lesão hepatocelular. Logo, a AST e ALT são doseadas para diagnóstico de doenças que apresentam lesão hepatocelular, como a hepatite aguda, a cirrose e os tumores necróticos.^{22,24,34}

A atividade da AST e da ALT é determinada usando as reações que estas catalisam. A AST catalisa a transferência do grupo amino do L-aspartato para o α -cetogluturato, formando oxaloacetato. Na presença de malato desidrogenase e NADH, o oxaloacetato é reduzido a L-malato e o NADH é oxidado a NAD^+ . Já a ALT, catalisa a transferência do grupo amino da L-alanina para o α -cetogluturato, produzindo piruvato. O piruvato, na presença de NADH e LDH, é reduzido a L-lactato e o NADH é oxidado a NAD^+ . Em ambas as determinações, existe a produção de NAD^+ , que leva a uma diminuição da absorvância a 340nm proporcional à atividade da enzima presente na amostra.²⁴

Gama-Glutamiltransferase (GGT)

A GGT é uma enzima que está presente nos rins, no fígado, no sistema biliar, no pâncreas e na próstata. O seu aumento no soro é comumente associado à colestase (diminuição ou paragem do fluxo biliar), pois esta enzima encontra-se presente em grande quantidade na membrana dos canalículos biliares. Porém, este aumento também pode acontecer quando há distúrbios tubulares renais, abuso de álcool ou toma de fármacos hepatotóxicos. Logo, apesar da GGT ser um marcador sensível de colestase, este não é específico e por isso, é importante existir o doseamento simultâneo da GGT e da FA.^{22,24,35}

A GGT catalisa a transferência do grupo glutamil da γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina, produzindo 3-carboxi-4-nitroanilina, um produto corado, que absorve a 410 nm. Logo, para determinar a sua atividade é medido o aumento da absorvância a 410nm. Este aumento é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra.²⁴

Fosfatase alcalina (FA)

A FA é uma hidrólase que remove grupos fosfato de mono-ésteres e que está bastante distribuída pelo organismo, particularmente, no fígado, no osso, no rim e no intestino. O seu aumento no soro é principalmente associado a doenças colestáticas e a doenças ósseas.

Nas doenças colestáticas, como a cirrose biliar primária ou as neoplasias das vias biliares, o aumento de FA ocorre devido a lesões a nível dos canalículos biliares, o que provoca um aumento simultâneo dos níveis de GGT. Mas, o aumento de FA isolado pode ocorrer nas doenças ósseas e quando ocorre formação óssea, na infância e na adolescência, devido ao aumento da atividade dos osteoblastos. Logo, a FA e a GGT devem ser analisados simultaneamente para realizar diagnóstico.^{22,24,35}

A FA catalisa a hidrólise de p-nitrofenil fosfato (composto incolor) a p-nitrofenol, um composto corado, que absorve a 405nm. O aumento da absorvância a 405nm é diretamente proporcional à atividade da FA na amostra.²⁴

Lactato desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima presente no citoplasma da maioria das células do organismo e por isso, o aumento dos seus níveis no soro é muito inespecífico, estando presente em qualquer situação relacionada com dano celular, incluindo na lesão hepática. As patologias mais associadas ao aumento da LDH são anemia hemolítica, miopatias, neoplasias, enfarte agudo do miocárdio, hepatite e muitas outras. Logo, é necessária uma análise integrada de todos os resultados laboratoriais, de modo a realizar o diagnóstico correto.³⁶

A LDH é doseada aplicando a reação de oxidação do L-lactato a piruvato e redução do NAD^+ a NADH, catalisada por esta enzima. O NADH formado aumenta a absorvância a 340nm, sendo este aumento diretamente proporcional à atividade da LDH.²⁴

Bilirrubina

A bilirrubina é o principal produto resultante da degradação do grupo heme das hemeproteínas (hemoglobina, mioglobina, citocromos e peroxidases), principalmente da hemoglobina de eritrócitos senescentes. A conversão do grupo heme no sistema reticuloendotelial dá origem à bilirrubina não conjugada ou indireta, uma forma lipossolúvel, que quando é libertada no sangue é transportada ligada à albumina pelo sistema porta até ao fígado. No interior dos hepatócitos, a bilirrubina indireta é conjugada com ácido glucurónico, dando origem a bilirrubina conjugada ou direta. A bilirrubina direta, como é solúvel em água, é excretada na bÍlis, que se acumula na vesícula biliar e é libertada no intestino. No intestino, a bilirrubina direta é convertida pelas bactérias intestinais em urobilinogénio. A maioria deste é oxidado a estercobilina e é eliminado nas fezes, mas parte é reabsorvido pelo intestino e entra no circuito entero-hepático. O que entra neste circuito é reexcretado pela bÍlis ou atinge a corrente sanguínea e chega aos rins, sendo convertida em urobilina, que é excretada na urina.^{22,24,30}

A icterícia é o aparecimento de uma coloração amarela na pele, nas mucosas e nas escleróticas, causada pelo aumento de bilirrubina na corrente sanguínea. Este aumento pode ser devido à bilirrubina direta e/ou indireta e pode ter várias causas. Os aumentos dos níveis de bilirrubina indireta ocorrem devido ao aumento da sua produção, como ocorre na hemólise e na rabiomiólise, ou devido à diminuição da captura e da biotransformação a nível hepático, que pode ocorrer nas doenças hepáticas com lesão hepatocelular ou com alguns fármacos. Já a bilirrubina direta aumenta principalmente na colestase, porque ao existir uma diminuição do fluxo biliar, esta não é encaminhada para o intestino, sendo reabsorvida a nível sanguíneo. Quando esta atinge os rins, é filtrada e eliminada na urina, tornando-a escura.^{22,24}

Para diagnosticar a causa de icterícia é realizado o doseamento de bilirrubina total e direta. Estes doseamentos são baseados na reação de diazotização com formação de um composto corado, a azobilirrubina, que aumenta a absorvância a 548nm. Este aumento é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina na amostra. No doseamento da bilirrubina total é adicionado um agente solubilizador que permite solubilizar a bilirrubina indireta, de modo que toda a bilirrubina seja medida.²⁴ A bilirrubina indireta é calculada através da diferença entre a bilirrubina total e a direta.

Proteínas totais e Albumina

As proteínas plasmáticas são sintetizadas principalmente no fígado, como ocorre com a albumina e os fatores de coagulação, mas também podem ser sintetizadas pelos linfócitos B ativados, como ocorre com as imunoglobulinas. As proteínas plasmáticas apresentam funções estruturais, enzimáticas, hormonais, de transporte de várias substâncias e de manutenção da pressão osmótica.^{22,24,30}

As proteínas totais podem encontrar-se alteradas em diversas patologias. A diminuição das proteínas totais no soro acontece quando existe a diminuição da síntese, como ocorre nas doenças hepáticas, o aumento da perda, nas queimaduras, nas hemorragias e na má absorção, ou o aumento da perda, na glomerulonefrite e na síndrome nefrótica. Um aumento das proteínas totais pode estar associado a desidratação grave, o que leva a uma concentração das proteínas, ou devido a uma gamapatia monoclonal, como o mieloma múltiplo.^{22,24,30}

A albumina é a principal proteína do soro, sendo a que mais contribui para a manutenção da pressão oncótica. Como esta é exclusivamente sintetizada pelo fígado, permite avaliar a síntese hepática, sendo essencial no diagnóstico e na monitorização de doença hepática. Para além da diminuição da síntese hepática, a diminuição da albumina pode estar relacionada com um aumento da perda a nível renal ou devido a um problema nutricional, sendo necessária uma análise conjunta de parâmetros laboratoriais e clínicos, de modo a realizar o diagnóstico correto. Geralmente, em casos de diminuição da albumina no soro, existe edema, devido à diminuição da pressão oncótica, que faz com que a água se movimente para o espaço extracelular.^{22,24,30}

A quantificação das proteínas totais é realizada usando o método do biureto. O biureto apresenta iões de cobre que reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas, formando um complexo corado que pode ser medido por espectrofotometria e que é diretamente proporcional à concentração de proteínas.²⁴ Já o doseamento da albumina baseia-se na reação com o verde de bromocresol, que forma um complexo corado, cuja absorvância

pode ser medida a 628nm. Esta absorvância é diretamente proporcional à concentração de albumina na amostra.²⁴

VI. Avaliação da lesão muscular

O coração e o músculo esquelético apresentam no interior das suas células uma grande quantidade de proteínas e enzimas, que são libertadas quando existe lise celular. Deste modo, moléculas que sejam predominantemente encontradas nestes tecidos podem ser utilizadas para avaliar a lesão muscular, sendo considerados marcadores desta.

Estes marcadores são utilizados principalmente para diagnóstico de doenças cardíacas, nomeadamente, o enfarte agudo do miocárdio (EAM), e de rabdomiólise. As lesões a nível cardíaco podem ser isquémicas ou não isquémicas e envolvem a morte das células musculares cardíacas (miócitos), colocando em risco a vida do paciente.^{24,30} A rabdomiólise é caracterizada pela destruição acentuada das células musculares esqueléticas e pode ocorrer devido a traumas, consumo de álcool e drogas, toma de medicamentos, como as estatinas, e exercício físico intenso. Quando existe rabdomiólise, o doente tem mialgias, fraqueza muscular e urina escura.³⁰

Para realizar a avaliação destas 2 patologias, no HUC, é realizado o doseamento da creatina cinase (CK) e da mioglobina. Para além disso, é realizado o doseamento da troponina I cardíaca de alta sensibilidade (hscTnl) e dos péptideos natriuréticos, que são marcadores mais específicos de lesão cardíaca.

Creatina cinase (CK)

A CK é uma enzima intracelular constituída por 2 subunidades M e B, que permitem originar 3 isoenzimas: a CK-MM (encontra-se predominantemente no músculo esquelético), a CK-MB (encontra-se predominantemente no músculo cardíaco) e a CK-BB (encontra-se predominantemente no cérebro). Como a CK está presente no interior das células musculares, quando existe lise destas células, esta é libertada, existindo um aumento dos seus níveis na corrente sanguínea. Mas como esta enzima não é específica de tecido, deve ser analisada juntamente com outros marcadores.^{24,30,37}

A atividade da CK é determinada usando uma cadeia de reações. A CK catalisa a transferência do fosfato da creatina fosfato para o ADP, produzindo ATP, que na presença de hexocinase, fosforila a glicose, formando glucose-6-fosfato. Esta é oxidada pela G6PD havendo redução do NADP⁺ a NADPH. O aumento do NADPH pode ser determinado medindo a absorvância a 340nm, que é diretamente proporcional à atividade da CK.²⁴

Mioglobina

A mioglobina é uma proteína de baixo peso molecular que liga o O₂ no músculo cardíaco e no músculo esquelético. Tal como a CK, a mioglobina é libertada das células musculares quando estas sofrem lise, existindo um aumento dos seus níveis no sangue, mas este ocorre mais rapidamente, que no caso da CK. Apesar do doseamento da mioglobina no soro ter uma sensibilidade elevada, esta não pode ser usada isoladamente, devido à sua baixa especificidade e à sua rápida eliminação a nível renal, na forma de urobilinogénio. Quando é libertada uma grande quantidade de mioglobina, o organismo deixa de ter capacidade de transformá-la e ela é eliminada na urina. Logo, o doseamento da mioglobina no soro e na urina auxilia no diagnóstico de lesão muscular.^{24,30}

Para dosear a mioglobina são utilizadas partículas de látex revestidas de anticorpos anti-mioglobina humana. Estas partículas têm a capacidade de se ligar à mioglobina existente na amostra, existindo aglutinação, que é medida por turbidimetria.

Troponina I cardíaca de alta sensibilidade (hs-cTnI)

A troponina é um complexo constituído por 3 proteínas, a troponina C (TnC), a troponina I (TnI) e a troponina T (TnT), que são essenciais para a contração do músculo esquelético e cardíaco. A TnI e a TnT apresentam formas distintas no músculo cardíaco e no músculo esquelético, o que permite distinguir a sua origem. Desta forma, quando existe lesão do miocárdio, existe a destruição dos miócitos com libertação de TnI e TnT cardíacas. Estas começam a aumentar após 3 a 12h e ficam elevados, no máximo, 2 semanas. Devido à sua elevada especificidade e sensibilidade e devido à sua estabilidade no sangue, as troponinas cardioespecíficas são consideradas ideias para o diagnóstico de EAM (morte irreversível dos miócitos devido a isquémia). Contudo, o dano nos miócitos pode ocorrer noutras patologias cardíacas, como na miocardite, ou não cardíacas, como na insuficiência renal e na sépsis, e por isso, é necessário avaliar outros marcadores,^{22,30}

No HUC é realizado o doseamento da TnI cardíaca de alta sensibilidade (hs-cTnI) no soro, utilizando o método de CMIA. Neste método existe a deteção da luz emitida, que é diretamente proporcional à quantidade de hs-cTnI existente na amostra.

Péptidos natriuréticos (BNP e NT-pro-BNP)

Quando existe estiramento da parede ventricular ou sobrecarga de volume, os miócitos dos ventrículos sintetizam o pré-pro-BNP, que é convertido em pro-BNP. O pro-BNP é posteriormente clivado em 2 péptidos: a porção N-terminal do pro-BNP (NT-pro-BNP) e o péptido natriurético tipo B (BNP), que corresponde à forma fisiologicamente ativa. Esta

substância é libertada de modo a manter a homeostase da água e dos eletrólitos, de modo a impedir que exista a acumulação de líquidos no organismo, inibindo a libertação da aldosterona e estimulando a diurese e a vasodilatação.^{22,24}

Logo, quando existe uma alteração da fisiologia ventricular, como ocorre nas patologias cardíacas, os níveis de BNP e NT-pro-BNP aumentam na corrente sanguínea. Este aumento é proporcional à gravidade da doença, mas também depende da idade e do sexo do doente. Apesar de existir o aumento de ambas as proteínas, o NT-pro-BNP é detetado durante mais tempo, porque tem uma maior estabilidade, devido à eliminação mais lenta, e atinge uma maior concentração sanguínea. Mas, apesar disso, tanto o BNP como o NT-pro-BNP são utilizados para diagnóstico e monitorização de insuficiência cardíaca, devido à sua especificidade e sensibilidade.^{22,24}

O doseamento de BNP e de NT-pro-BNP é realizado utilizando o método de CMIA, que é caracterizado pela emissão de luz proporcional à concentração de analito presente na amostra. Para cada parâmetro é realizado um ensaio de CMIA com anticorpos específicos do analito e é utilizada a amostra adequada, que no caso do BNP é sangue total colhido com K₃-EDTA e do NT-pro-BNP é soro.

VII. Outros doseamentos

Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda muito sensível sintetizada principalmente no fígado, que aumenta a nível plasmático quando existe inflamação, infeção, lesão tecidual ou neoplasias. Desta forma, a PCR é usada quando o clínico desconfia de um processo infeccioso ou inflamatório, como artrite reumatoide, asma, pancreatite, doença cardiovascular, entre outros, e para monitorizar a resposta dos doentes a terapêutica e a cirurgias.^{22,24}

A quantificação da PCR no soro é realizada por turbidimetria, utilizando partículas de látex que apresentam adsorvidos anticorpos anti-PCR. Estes reagem com o PCR da amostra, existindo aglutinação, que é detetada pela diminuição da luz transmitida a 572nm. Esta variação é diretamente proporcional à concentração de PCR na amostra.³⁸

Sangue oculto nas fezes

A pesquisa de sangue oculto nas fezes tem como objetivo detetar sangue que é invisível a olho nu, que pode aparecer devido a distúrbios ou doenças intestinais. Apesar de poder estar associado a várias patologias, este teste é considerado um teste de rastreio para a deteção do cancro colorretal e por essa razão, caso o resultado seja positivo, o doente deve realizar uma

colonoscopia. Esta é a técnica gold-standard para o diagnóstico do cancro colorretal, mas não é realizada em todos os indivíduos, pois é uma técnica invasiva e desconfortável para o paciente.^{22,39}

As amostras que são analisadas no HUC são amostras colhidas pelos pacientes e enviadas por centros de saúde de todo o país. Para realizar a colheita, o utente deve recolher uma pequena quantidade de fezes para um tubo fornecido pelo centro de saúde, que contem um tampão. Quando estes tubos chegam ao HUC é realizada uma triagem, de modo a verificar se as condições de colheita foram respeitadas. Posteriormente, estes tubos são introduzidos no aparelho SENTiFIT 270, que utiliza um método imunológico para deteção de hemoglobina humana.³⁹

8. Caso clínico

Introdução

A *Streptococcus pyogenes* é um coco Gram positivo beta-hemolítico pertencente ao grupo A de Lancefield e que pode causar uma grande variedade de infeções, nomeadamente a faringoamigdalite. A faringoamigdalite estreptocócica ocorre principalmente em crianças e adolescentes, com idade entre os 5 e os 15 anos, sendo responsável por apenas 5 a 15% destas infeções em adultos.^{40,41} Neste caso, descreve-se uma faringoamigdalite numa paciente do sexo feminino com 44 anos.

Descrição do caso

Mulher com 44 anos recorre ao Serviço de Urgências do HUC por dor de garganta com 6 dias de evolução e agravamento progressivo com disfagia. Não tem diagnóstico prévio de doenças ou alergias medicamentosas e não toma medicação habitual.

Quando questionada sobre o seu estado geral, negava febre e dispneia. Ao exame físico destacava-se um abaulamento do palato na zona da amígdala esquerda com edema exuberante e desvio lateral da úvula. Apresentava dor à palpação do pescoço, mas sem sinais de inflamação ou tumefação, e uma temperatura corporal de 37,9°C (febre).

De modo a realizar uma avaliação microbiológica e melhorar os sintomas, foi realizada uma punção no local de edema, com saída de 6mL de conteúdo purulento. Para além disso, foram solicitadas análises hematológicas e bioquímicas. Nestas análises, destacavam-se uma contagem leucocitária de $14.00 \times 10^9/L$, com neutrofilia marcada (12.20×10^9 neutrófilos/L), e uma PCR de 17.95mg/dL. Os restantes parâmetros encontravam-se normais, como pode ser observado na Tabela X.

Tabela X - Análises realizadas no HUC

Parâmetros	Resultado	Valores de Referência
Eritrócitos	4.44	4.0-5.2 × 10 ¹² /L
Hemoglobina	14.6	12.0-16.0g/dL
Volume Corpuscular Médio	94.1	80-100fl
Hemoglobina Corpuscular Média	32.9	26-34pg
Hematócrito	41.8	36-46%
Leucócitos	14.00	3.90-10.20 × 10 ⁹ /L
Neutrófilos	12.20	1.50-7.70 × 10 ⁹ /L
Linfócitos	1.08	1.10-4.50 × 10 ⁹ /L
Monócitos	0.70	0.10-0.90 × 10 ⁹ /L
Eosinófilos	0.02	0.02-0.50 × 10 ⁹ /L
Basófilos	0.02	0.00-0.20 × 10 ⁹ /L
Plaquetas	280	150-400 × 10 ⁹ /L
Glicose	105	60-109mg/dL
Azoto ureico	11.8	7.9-20.9mg/dL
Creatinina	0.65	0.55-1.02mg/dL
Na ⁺	140	136-146mmol/L
K ⁺	3.7	3.5-5.1mmol/L
Cl ⁻	104	101-109mmol/L
Osmolalidade	279	260-302mOSM/Kg
LDH	191	<247U/L
CK	83	<145U/L
PCR	17.95	<0.50mg/dL

A nível microbiológico, a partir da amostra de pus de abscesso foi realizado um esfregaço para coloração de Gram e foram feitas sementeiras nos meios de cultura Gs e CM.

Estes meios foram incubados a 37°C em atmosfera capnófila durante 24h. A observação microscópica da lâmina revelou a presença de muitos leucócitos, muitos cocos Gram positivos e muitos bacilos Gram negativos sugestivos de anaeróbios. Após o período de incubação, observaram-se colónias pequenas e com beta-hemólise no meio Gs, como demonstrado na Figura 6. Como a cultura era pura, realizou-se a identificação no aparelho automatizado MALDI Biotyper®, que identificou como *Streptococcus pyogenes*.

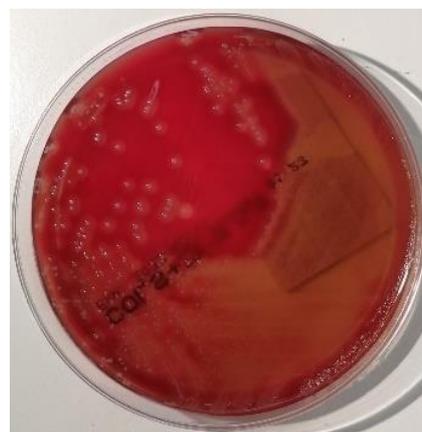


Figura 6- Crescimento bacteriano em meio Gs. (Imagem do CHUC)

Após identificação do microrganismo, procedeu-se à realização do TSA manual para *Streptococcus pyogenes*, utilizando o meio MHF, de acordo com as recomendações da EUCAST. Os resultados do TSA concluíram que a bactéria era sensível a penicilina, eritromicina, tetraciclina, levofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, clindamicina e vancomicina.

Como o meio CM se apresentava turvo e com escurecimento das partículas de carne, devido à degradação destas, e o esfregaço apresentava outros microrganismos, realizou-se um esfregaço para ser corado por Gram a partir do CM e inoculou-se no meio Gs. No esfregaço a partir do CM foram observados microrganismos semelhantes aos observados no esfregaço inicial e no meio Gs existiu o crescimento da mesma bactéria. Para além disso, o meio CM foi inoculado em meio CDC, KV e NE, para pesquisa de anaeróbios. Estes 3 meios foram incubados em anaerobiose e após a incubação verificou-se o crescimento de colónias no meio KV, que foram identificadas como *Provetella salivae*, no MALDI Biotyper[®].

Como a clínica e a morfologia bacteriana observada na coloração de Gram eram sugestivas de infeção, o médico prescreveu empiricamente amoxicilina/ácido clavulânico e metronidazol, para tratamento da infeção, e paracetamol e “Tantum”, para as dores e a inflamação, e deu alta à doente.

Após 5 dias, a doente foi reavaliada em consulta de otorrinolaringologia. Referia melhoria substancial da dor e negava dispneia, disfagia ou agravamento das queixas. Ainda se encontrava a cumprir a medicação prescrita. Ao exame físico, demonstrava o palato sem abaulamento e sem exsudatos. Voltou ao hospital 3 meses após a alta para reavaliação e encontrava-se clinicamente sem queixas.

Discussão

A faringoamigdalite é uma inflamação aguda da faringe e das amígdalas, que pode ter origem infecciosa, sendo causada por vírus respiratórios ou por bactérias, ou não infecciosa. Esta inflamação é caracterizada por dor de garganta, disfagia, febre e aumento da vermelhidão dos locais afetados. Quando a faringoamigdalite tem origem infecciosa, existe o aparecimento de exsudatos na zona de inflamação, o que não se verifica, quando tem origem não infecciosa.⁴²

Como a doente apresentava dor de garganta, disfagia, febre e um abscesso faringoamigdalítico, foram realizadas análises. Analiticamente, a presença de neutrofilia marcada e da PCR aumentada sugere a presença de uma infeção bacteriana. Com a realização de culturas de pus de abscesso, a observação do esfregaço corado por Gram e a identificação dos microrganismos presentes, foi possível identificar *Streptococcus pyogenes* e *Provetella salivae*. Como a *Provetella salivae* pertence à microbiota oral, esta foi descartada como causadora da infeção e concluiu-se que a faringoamigdalite era causada pelo *Streptococcus pyogenes*.

Nos adultos, a maioria das faringoamigdalites infecciosas são causadas por vírus respiratórios, mas em 5 a 15% dos casos, estas são causadas por *Streptococcus pyogenes*, uma bactéria que é responsável por 20 a 40% destas infeções nas crianças. Quando existe o diagnóstico de uma faringoamigdalite infecciosa, é necessário saber qual o microrganismo

responsável por esta, pois o tratamento é diferente. Ao contrário das faringoamigdalites virais, em que apenas são tratados os sintomas, as causadas por *Streptococcus pyogenes* devem ser tratadas com antibioterapia adequada, porque estas infeções podem levar a complicações graves, como a febre reumática e a glomerulonefrite aguda.^{40,41,42} Neste caso, a paciente foi sujeita a terapêutica empírica com antibióticos e evoluiu favoravelmente, sem desenvolvimento de nenhuma complicação.

Este caso torna-se incomum, porque a paciente era uma adulta que desenvolveu uma faringoamigdalite causada por *Streptococcus pyogenes*.

Conclusão

Com este caso, concluímos que apesar do *Streptococcus pyogenes* não ser a principal causa de faringoamigdalites infecciosas em adultos, é necessário estar atento a este tipo de infeções, pois a ausência de tratamento antibiótico, pode levar ao desenvolvimento de doenças graves.

9. Conclusão

A realização do estágio no SPC-CHUC permitiu-me ter uma visão geral da rotina laboratorial, participar na realização das diversas técnicas e aplicar e consolidar os conhecimentos obtidos no Mestrado em Análises Clínicas.

Penso que o facto deste estágio ter sido realizado num contexto hospitalar, me permitiu contactar com uma diversidade de amostras, de utentes e de técnicas que não estão presentes nos laboratórios privados, nomeadamente as técnicas realizadas no setor de Autoimunidade. Desta forma, adquiri novos conhecimentos essenciais para a minha vida profissional. Isto não teria sido possível sem a colaboração de todos os profissionais de saúde, que me transmitiram todos os conhecimentos possíveis.

Relativamente ao relatório de estágio, este teve como principal objetivo reforçar os conhecimentos adquiridos durante o estágio e a demonstração das atividades realizadas nas áreas de Microbiologia e Bioquímica Clínica.

10. Bibliografia

- (1) **Despacho n.º 10009/2019, de 5 de novembro.** Portugal: Diário da República, 5 de novembro de 2019. [Acedido a 24 de janeiro de 2023]. Disponível na Internet: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/10009-2019-125879568>
- (2) HOFFBRAND, A. Victor; A.H. MOSS, Paul - **Hoffbrand's Essential Haematology.** 7ª Ed. [S.l.]: Wiley Backwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4.
- (3) MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Microbiologia Médica.** 8ª Ed. St. Luis: Elsevier, 2017. ISBN 978-85-352-8575-8.
- (4) TILLE, Patricia M. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 14ª Ed. St. Louis: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-35482-0.
- (5) MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C. - **Textbook of Diagnostic Microbiology.** 6ª Ed. St. Luis: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-323-48218-9.
- (6) NESTER, Eugene W. et al. - **Microbiology: A Human Perspective.** 7ª Ed. New York: McGraw-Hill Education, 2011. ISBN 978-0-07-337531-1.
- (7) POWER, David A. et al. - **Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media.** 2ª Ed. Sparks: Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN 0-9727207-1-5.
- (8) CÂMARA, Brunno – **Técnicas de semeadura.** [S.l.]: Biomedicina Padrão: 21 de março de 2023. [Acedido a 1 de abril de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/09/tecnicas-de-semeadura.html>
- (9) **MALDI-TOF/TOF.** [S.l.]: BRUKER. [Acedido a 20 de março de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html>
- (10) **Microbial Identification.** [S.l.]. BRUKER. [Acedido a 20 de março de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification.html>
- (11) SMITH, David A.; NEHRING, Sara M. – **Bacteremia.** In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. [Acedido a 4 de abril de 2023]. Disponível na Internet: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28723008/>
- (12) CENCI, Elio et al. - **Accelerate Pheno™ blood culture detection system: a literature review.** Future microbiology. 15 (2020), 1595-1605.
- (13) KWAGHE, Ayi Vandi et al. - **Prevalence and molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis complex in cattle and humans, Maiduguri, Borno state, Nigeria: a cross-sectional study.** BMC microbiology. 23, 7 (2023).

- (14) KARGUPTA, Roli et al. - **Rapid culture-based detection of living mycobacteria using microchannel electrical impedance spectroscopy (m-EIS)**. *Biological research*. 50, 21 (2017).
- (15) SIDDIQUI, Salman H.; RÜSCH-GERDES, Sabine – **MGIT™ Procedure Manual: For BACTEC™ MGIT 960™ TB System**. Borstel: 2006.
- (16) **Bioline™ TB Ag MPT64: Test to discriminate between M. Tuberculosis Complex and MOTT(NTM)**. [S.l.]: Abbott. [Acedido a 25 de março de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.globalpointofcare.abbott/ww/en/product-details/bioline-tb-ag-mpt64-rapid.html>
- (17) **LIAISON QuantiFERON-TB Gold Plus (US)**. [S.l.]: QIAGEN. [Acedido a 25 de março de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/tb-management/liaison-quantiferon-tb-gold-plus-us>
- (18) ZEIBIG, Elizabeth A. – **Clinical Parasitology: A Practical Approach**. 2ª Ed. St. Luis: Elsevier, 2013. ISBN 978-1-4160-6044-4.
- (19) LEVINSON, Warren – **Review of Medical Microbiology and Immunology**. 10ª Ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2008. ISBN 9780071496209.
- (20) YOLKEN, Robert H.; STOPA, Peter J.- **Enzyme-linked fluorescence assay: ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavírus**. *Journal of clinical microbiology*. 10, 3 (1979), 317-321.
- (21) CINQUANTA, Luigi; FONTANA, Desré Ethel; BIZZARO, Nicola - **Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?**. *Auto-immunity highlights*. 8, 1 (2017).
- (22) MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23ª Ed. St. Louis: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-29568-0.
- (23) GAW, Allan et al. - **Clinical biochemistry: An illustrated colour text**. 5ª Ed. [S.l.]: Churchill Livingstone, 2013. ISBN 978-0-7020-5179-1.
- (24) BURTIS, Carl A., BRUNS, David E. - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 7ª Ed. St. Louis: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-4165-6.
- (25) SEO, Jong Do et al. - **Evaluation of analytical performance of Alinity i system on 31 measurands**. *Practical laboratory medicine*. 22 (2020).
- (26) **Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus**. Portugal: Direção Geral de Saúde, 2011. [Acedido a 5 de julho de 2023]. Disponível na Internet:

<https://normas.dgs.min-saude.pt/2011/01/14/diagnostico-e-classificacao-da-diabetes-mellitus/>

- (27) MORIYA, Junji - **Critical roles of inflammation in atherosclerosis**. Journal of cardiology. 73, 1 (2018), 22-27.
- (28) ABBOTT Laboratories – **Alinity c: Ultra HDL Reagent Kit**. Canada: 2018.
- (29) ABBOTT Laboratories – **Alinity c: Direct LDL Reagent Kit**. Canada: 2022.
- (30) LARSON, Donna - **Clinical Chemistry: Fundamentals and Laboratory Techniques**. 1ª Ed. St. Louis: Elsevier, 2017. ISBN 978-1-4557-4214-1.
- (31) ABBOTT Laboratories – **Alinity c: Creatinine Reagent Kit**. Germany: 2018.
- (32) STRASINGER, Susan King; DI LORENZO, Marjorie - **Urinalysis and Body Fluids**. 5ª Ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2008. ISBN 978-0-8036-1697-4.
- (33) FOGAZZI, Giovanni B.; GARIGALI, Giuseppe – **The Urinary Sediment by sediMAX: A new approach to urinary sediment examination**. [S.I.]: EDRA, 2016.
- (34) VROON, David H.; ISRAILI, Zafar – **Aminotransferases**. In: WALKER, H. Kenneth. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Boston: Butterworths, 1990. ISBN 978-0409900774, 492-493.
- (35) VROON, David H.; ISRAILI, Zafar – **Alkaline Phosphatase and Gamma Glutamyltransferase**. In: WALKER, H. Kenneth. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Boston: Butterworths, 1990. ISBN 978-0409900774, 494-496.
- (36) KLEIN, Robert et al. – **Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals**. Veterinary medicine internacional. 2020 (2020).
- (37) CABANISS, C. Daniel – **Creatine Kinase**. In: WALKER, H. Kenneth. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Boston: Butterworths, 1990. ISBN 978-0409900774, 161-163.
- (38) ABBOTT Laboratories – **Alinity c: CRP Vario Reagent Kit**. Italy: 2017.
- (39) **SENTiFIT 270 Analyser, [S.I.]: Sysmex**. [Acedido a 13 de julho de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/sentifit-270-analyser.html>
- (40) KANWAL, Sidrah; VAITLA, Pradeep – **Streptococcus Pyogenes**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. [Acedido a 16 de julho de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554528/>

- (41) WESSELS, Michael R. – ***Streptococcus pyogenes*: Pharyngitis and Scarlet Fever**. In: FERRETTI, Joseph J.; STEVENS, Dennis L.; FISCHETTI, Vincent A. *Streptococcus pyogenes*: Basic Biology to Clinical Manifestations. Oklahoma City: University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016.
- (42) BROOK, - **Pharyngotonsillitis**. In: SCHLOSSBERG, David. *Clinical Infectious Disease*. Philadelphia: Cambridge University Press, 2015. ISBN 9781139855952, 33-41.