



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristiana Inês Simões Catela

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pela
Dra. Alice Mendes e apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra

Julho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristiana Inês Simões Catela

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pela Dra. Alice Mendes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Julho de 2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer ao Dr. Fernando Rodrigues por permitir a realização do estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Agradeço a toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica do CHUC, especialmente à Dra. Alice Mendes e à Dra. Cristiana Canha, que me acolheram da melhor forma possível, e desde o início me orientaram de modo a que adquirisse o máximo de conhecimento possível, mostrando-se sempre disponíveis a ajudar.

Agradeço à Professora Doutora Ana Miguel Matos, que na qualidade de orientadora interna, se mostrou sempre disponível para me ajudar e rever o presente relatório de forma crítica.

A todos os Professores com quem tive o privilégio de me cruzar nestes últimos dois anos, muito obrigado pelo todo o conhecimento que me transmitiram.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer à minha família por me permitir e ajudar a atingir os meus objetivos. Obrigado não é o suficiente para expressar a minha gratidão por todo o apoio incondicional que me deram.

A todos,
O meu muito obrigada!

Índice

Lista de Abreviaturas	11
Lista de Tabelas.....	15
Lista de Figuras	15
Resumo.....	17
Abstract.....	17
1. LABORATÓRIO	19
2. AMOSTRAS	19
3. CONTROLO DE QUALIDADE	20
4. BIOQUÍMICA	21
4.1. Equilíbrio Hidro-Eletrolítico.....	22
4.1.1. Sódio (Na^{2+}).....	22
4.1.2. Potássio (K^{+}).....	22
4.1.3. Cloro (Cl^{-}).....	22
4.1.4. Bicarbonato (HCO_3^{-}).....	23
4.1.5. Osmolalidade.....	23
4.2. Metabolismo Mineral	23
4.2.1. Cálcio (Ca^{2+}).....	23
4.2.2. Fosfato (PO_4^{3-})	24
4.2.3. Magnésio (Mg^{2+}).....	24
4.3. Função Hepática e Biliar	24
4.3.1. Aminotransferases.....	25
4.3.2. Fosfatase Alcalina.....	25
4.3.3. Gama Glutamil transferase.....	26
4.3.4. Bilirrubina	26
4.3.5. Proteínas Totais.....	27
4.3.6. Albumina.....	27
4.3.7. Tempo de Protrombina	28
4.4. Função Renal	28
4.4.1. Ureia.....	28
4.4.2. Ácido Úrico	28
4.4.3. Creatinina.....	29
4.4.4. Taxa de Filtração Glomerular	29
4.4.5. Proteinúria	30
4.4.6. Urina Tipo II ou Sumária de Urina	30
4.5. Função Cardíaca.....	32
4.5.1. Mioglobina	33

4.5.2. Creatina Cinase	33
4.5.3. Peptídeo Natriurético B	33
4.5.4. Troponinas Cardíacas.....	34
4.6. Metabolismo dos Lípidos	34
4.6.1. Colesterol Total	35
4.6.2. Colesterol HDL.....	35
4.6.3. Colesterol LDL.....	35
4.6.4. Triglicerídeos.....	35
4.7. Outros Doseamentos.....	36
4.7.1. Proteína C Reativa	36
4.7.2. Glicose	36
4.7.3. Hemoglobina Glicada	37
4.7.4. Lactato Desidrogenase	37
4.7.5. α -Amílase	37
4.7.6. Lípase.....	37
4.8. Metodologias	38
4.8.1. Espectrofotometria.....	38
4.8.2. Turbidimetria.....	38
4.8.3. Potenciometria.....	38
4.8.4. Quimioluminescência	38
5. IMUNOLOGIA	39
6. HEMATOLOGIA.....	40
7. MICROBIOLOGIA.....	41
7.1. Bacteriologia.....	41
7.1.1. Exame Microscópico	41
7.1.2. Cultura.....	42
7.1.3. Identificação	45
7.1.4. Testes de Suscetibilidade ao Antimicrobianos	46
7.1.5. Amostras	47
7.2. Micobacteriologia	52
7.2.1. Preparação das amostras	53
7.2.2. Exame Microscópico	53
7.2.3. Cultura.....	54
7.2.4. Identificação	55
7.3. Micologia.....	55
7.4. Virologia.....	56
7.5. Serologia	56

7.5.1. Métodos Utilizados.....	57
7.6. Parasitologia	59
7.6.1. Diagnóstico Laboratorial	60
8. CASOS CLÍNICOS.....	62
9. CONCLUSÃO.....	67
10. REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP- Fosfatase Alcalina

ALT- Alanina Aminotransferase

aPTT- Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

AST- Aspartato Aminotransferase

BAAR- Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BCSA- meio de cultura para *Burkholderia cepacia*

BHI- meio de cultura *Brain Heart Infusion*

BNP- Peptídeo Natriurético B

CAM- meio de cultura para *Campylobacter* spp.

CBGN- Caldo para Bacilos Gram Negativo

CHUC- Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

CIN- meio de cultura para *Yersinia* spp. com Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina

CK- Creatina Cinase

CK-MB- Creatina Cinase isoforma MB

CLED- meio de cultura com Cistina, Lactose e Deficiente em Eletrólitos

CLIA- Ensaio Imunoquimioluminescente

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CM- Meio de cultura *Cooked Meat*

CMI- Concentração Mínima Inibitória

CNA- Meio de cultura Agar Columbia com Colistina e Ácido Nalidíxico

CrCl- Clearance de Creatinina

cTnI- Troponina I Cardíaca

cTnT- Troponina T Cardíaca

DCV- Doença Cardiovascular

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DPOC- Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

EAM- Enfarte Agudo do Miocárdio

EDTA- Ácido Etileno-Diamino Treta-Acético

ELFA- *Enzyme Linked Fluorescence Assay*

ELISA- *Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay*

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FEIA- Imunoensaio fluoroenzimático

FISH- *Fluorescent in situ Hybridization*

FQ- Fibrose Quística

GGT- Gama-Glutamil Transferase

GS- Gelose de Sangue

HAE- meio de cultura para *Haemophilus* spp.

HAV- Vírus da Hepatite A

HBV- Vírus da Hepatite B

HDL- Lipoproteína de Alta Densidade

HEV- Vírus da Hepatite E

HG- Hospital Geral dos Covões

HP- Hospital Pediátrico

HUC- Hospital Universitário de Coimbra

IFI- Imunofluorescência Indireta

LCR- Líquido Cefalorraquidiano

LDH- Lactato Desidrogenase

LDL- Lipoproteína de Baixa Densidade

LJ- Meio de cultura Löwenstein-Jensen

MALDI-TOF MS- *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

MGIT- Mycobacterium Growth Indicator Tube

MH- Meio de cultura Muller-Hinton

MH-F- Meio de cultura Muller-Hinton chocolate

NALC- N-Acetil-L-Cisteína

NEQAS- *National External Quality Assessment Site*

NT-pro-BNP- N-terminal do pro-BNP

PANTA- Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidixico, Trimetoprim e Azlocilina

PCR- Polymerase Chain Reaction

PCR- Proteína C Reativa

PTH- Hormona Paratiroideia

PVX- Gelose de Chocolate PolyViteX

RIQAS- *Randox International Quality Assessment Scheme*

RNA- Ácido Ribonucleico

RPR- Rapid Plasma Reagin

SGC2- Meio de cultura Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol

SS- Meio de cultura para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

TFG- Taxa de Filtração Glomerular

THP- Tamm-Horsfall Protein

TP- Tempo de Protrombina

TP-PA- *Treponema Passive Particle Agglutination*

TSA- Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

VCAT- Meio de cultura para *Neisseria* spp. com Vancomicina, Colimicina, Anfotericina e Trimetoprim

VLDL- Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros avaliados na sumária de urina e o seu significado clínico.....	31
Tabela 2. Parâmetros avaliados no sedimento urinário e o seu significado clínico	32
Tabela 3. Metodologias e Análises, alguns exemplos- área de Imunologia	39
Tabela 4. Metodologias e Análises, alguns exemplos- área de Autoimunidade	40
Tabela 5. Meios de Cultura utilizados no setor de Microbiologia	43
Tabela 6. Técnicas de Sementeira utilizadas no setor de Bacteriologia	44
Tabela 7. Avaliação semi-quantitativa das culturas de urina.....	48
Tabela 8. Classificação da observação microscópica das amostras respiratórias	50
Tabela 9. Amostras biológicas e respetivos patogéneos mais frequentemente associados.....	52
Tabela 10. Metodologias e Análises, alguns exemplos- setor de Serologia	59
Tabela 11. Exemplos de parasitas intestinais encontrados nas fezes, após realização da técnica de concentração (Imagens adaptadas de CDC: Centers for Disease Control and Prevention)	60
Tabela 12. Exemplos de parasitas no sangue, observados em esfregaços sanguíneos finos após coloração por Giemsa (Imagens adaptadas de CDC: Centers for Disease Control and Prevention).....	61
Tabela 13. Exemplos de parasitas no sangue, observados em gota espessa após coloração por Giemsa (Imagens obtidas no CHUC)	61
Tabela 14. Resultados alterados nas análises de admissão hospitalar- bioquímica	75
Tabela 15. Resultados das análises de admissão hospitalar- hematologia.....	75
Tabela 16. Resultados obtidos no painel multiplex de hemoculturas do Accelarate Pheno®.	76
Tabela 17. Resultados alterados nas análises de rotina.....	77
Tabela 18. Resultados das repetições analíticas.....	77
Tabela 19. Resultados de hemograma simples	78
Tabela 20. Resultados de pesquisa de autoanticorpos	78
Tabela 21. Resultados da análise serológica.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento bacteriano na gelose de sangue	63
Figura 2. Antibiograma manual para <i>Pasteurella multocida</i> : tiras E-test.....	64

RESUMO

Ao longo do tempo, as Análises Clínicas têm-se tornado cada vez mais indispensáveis como meios complementares de diagnóstico, além de permitirem a monitorização da doença.

Este relatório pretende descrever a experiência adquirida com a realização do estágio curricular no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Este relatório engloba as principais áreas das Análises Clínicas: Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia, sendo que as valências de Bioquímica e Microbiologia se encontram descritas de forma mais detalhada. No final, encontram-se expostos dois casos clínicos, que permitem a consolidação dos conhecimentos adquiridos, além de permitirem evidenciar o papel das análises clínicas no diagnóstico patológico.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Bioquímica, Microbiologia.

ABSTRACT

Over time, Clinical Analyses have become increasingly indispensable complementary means of diagnosis, besides allowing the monitoring of the disease.

This report aims to describe the experience acquired during the internship at the Hospital Center of University of Coimbra (CHUC), within the scope of the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra.

This report covers the main areas of Clinical Analysis: Biochemistry, Immunology, Hematology and Microbiology, being that the valences of Biochemistry and Microbiology are described in detail. At the end, two clinical cases are exposed, which allow the consolidation of the acquired knowledge, as well as highlighting the role of clinical analysis in pathological diagnosis.

Keywords: Clinical Analysis, Biochemistry, Microbiology.

I. LABORATÓRIO

O serviço de patologia clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra é o produto da junção dos 3 grandes hospitais da região: Hospital Universitário de Coimbra (HUC), Hospital dos Covões (HG) e Hospital Pediátrico (HP), adicionalmente a Maternidade Daniel de Matos e a Maternidade Bissaya Barreto. O laboratório central encontra-se situado no 4º piso do edifício de São Gerónimo, no HUC.

Este serviço encontra-se dividido nas quatro principais áreas clínicas laboratoriais: Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia. A área da hematologia e bioquímica clínica está centrada no CoreLab, um formato de múltiplos analisadores em cadeia que fazem o processamento da amostra. Este é um processo automatizado que permite que diariamente sejam obtidos/relatados mais resultados, funcionando 24 horas por dia. Acoplado existe um sistema informático, o *Clinidata XXI*, onde se pode fazer a integração das amostras que chegam ao laboratório, validação dos resultados, bem como adicionar análises que faltem e rastrear os tubos, assim como verificar informações clínicas relevantes à validação dos resultados ou comparação dos resultados com o histórico do doente.

Além das amostras provenientes da própria sala de colheitas, o laboratório recebe também amostras das enfermarias do hospital pelo pneumático, e ainda de centros de saúde da zona (por exemplo para a pesquisa de sangue oculto) e de outros hospitais da região que não fazem certas análises devido ao reduzido número de pedidos, não se justificando o investimento. Do mesmo modo, o próprio CHUC envia certas amostras para fora, como para o Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, por exemplo.

2. AMOSTRAS

O processo analítico consiste em 3 fases essenciais: a fase pré analítica, fase analítica e fase pós analítica.

Fase pré analítica: para a colheita de amostras biológicas existe um conjunto de regras seguidas de modo a obter um produto que possa ser analisado e os resultados obtidos sejam fidedignos.

Primeiramente, é importante confirmar a identidade do doente. Depois é verificada a sua requisição de exames, tendo em atenção a possível necessidade preparações prévias para análise, como, por exemplo, o facto de ter que se estar em jejum para a determinação dos triglicerídeos ou glucose. Caso o utente traga amostra colhida pelo próprio também se deve confirmar que a obtenção da amostra foi feita da forma adequada. Se estiver tudo correto, procede-se à identificação dos tubos de colheita com etiquetas com a identidade do paciente,

tendo também identificado qual a área a que se destina. De seguida faz-se a colheita do material biológico.

Como já referido, existem certos parâmetros que se tem que cumprir nesta fase. Desde logo, a aplicação do garrote não deve exceder 1 minuto; em casos de provas de coagulação o volume de sangue colhido tem que obrigatoriamente ser o especificado pelo fabricante de modo a que a proporção sangue: anticoagulante seja a correta; e ainda, no caso de existirem múltiplos tubos, deve-se evitar a contaminação cruzada, pelo que a ordem estipulada pela Organização Mundial da Saúde é a seguinte: frasco de hemocultura, tubo sem aditivos, tubo para coagulação (com citrato de sódio), tubo com ativador de coágulo, tubo de separador sérico, tubo com heparina, tubo de separação de plasma, tubo de EDTA, tubo de sangue sem preparação ou com ativador de coagulação e, por fim, tubo com oxalato/fluoreto.

Após as amostras estarem nos tubos adequados, deve ser feita a homogeneização dos conteúdos, especialmente nos tubos com aditivos. Caso se pretenda usar soro, terá de se esperar o tempo necessário para a retração do coágulo antes da centrifugação.

Fase analítica: as amostras chegam à receção de amostras onde são triadas e é verificado quais as análises a serem feitas. Nesta fase é onde ocorre todo o processamento da amostra.

Fase pós analítica: por fim, após todo este processo de análise ocorre a interpretação dos resultados, relacionando todos os valores obtidos. No caso de não se encontrarem incongruências é realizada a validação dos resultados.

3. CONTROLO DE QUALIDADE

Os parâmetros laboratoriais são cada vez mais importantes no diagnóstico patológico e terapêutica. Como tal, é necessário garantir que os valores fornecidos sejam reais e correspondam à situação clínica do paciente.

Para tal, o laboratório participa em programas de controlo de qualidade, quer internos, quer externos, para obter resultados fiáveis, sendo estes controlos processados como se fossem amostras.

O **controlo interno de qualidade** é facultado pela empresa fornecedora do equipamento, consistindo em três níveis: nível 1 (baixo), nível 2 (médio) e nível 3 (alto). Este controlo é analisado todos os dias antes das amostras. De seguida, é avaliado o resultado obtido através da construção de cartas de controlo, para verificar se este se encontra dentro dos desvios padrão estabelecidos pela casa comercial e qual a precisão da determinação. Na eventualidade de ocorrerem erros, devem ser instauradas medidas corretivas, de modo a obter os valores normais.

O **controlo externo de qualidade** consiste num programa interlaboratorial, em que a *performance* de vários laboratórios é comparada. Assim, é possível avaliar a precisão e a exatidão dos métodos analíticos. Estes programas assentam na análise de amostras enviadas por entidades externas, em que não se conhecem os valores reais. As amostras são analisadas e é depois emitido um relatório que é enviado para a entidade responsável que vai comparar os resultados de todos os laboratórios participantes. Alguns exemplos de programas de controlo externo em que o Serviço de Patologia Clínica do CHUC participa são RIQAS e NEQAS.

4. BIOQUÍMICA

A química clínica permite avaliar determinados parâmetros bioquímicos de modo a analisar o estado fisiológico. A maioria das amostras biológicas utilizadas são o soro e urina, mas também pode ser usado o Líquido Cefalorraquidiano (LCR) e outros líquidos biológicos, fezes, cálculos e outros produtos biológicos.

Sendo o soro o principal produto biológico, ele é colhido para um tubo de gel separador, que posteriormente é centrifugado a 3000rpm por 15 minutos. Por outro lado, para a determinação da hemoglobina glicada e dos peptídeos natriuréticos é usado o tubo com K_3EDTA .

Estando o setor da bioquímica essencialmente presente no CoreLab, a maioria das análises é feita nos equipamentos *Alinity c*. As restantes determinações são realizadas nas salas de apoio à bioquímica, como é o caso da análise da urina, sangue oculto nas fezes, doseamento de fármacos e metais e a determinação da composição dos cálculos.

Sendo uma parte do estágio na bioquímica passada no Hospital Pediátrico, verificou-se a grande diferença existente em termos de quantidade de amostra obtida. Assim, os tubos de colheita são adequados à população pediátrica, de modo a que as proporções entre os constituintes do tubo e o líquido biológico sejam as ideais a permitir um resultado fidedigno.

No HP realiza-se ainda os testes de suor como complemento ao diagnóstico da Fibrose Quística. Na colheita é feita a estimulação do suor no pulso, onde depois é colhido. Nesta amostra vai-se determinar a concentração de NaCl e de Cloreto, em que sendo uma amostra positiva, irão estar aumentados.

4.1. Equilíbrio Hidro-Eletrolítico

4.1.1. Sódio (Na^{2+})

O sódio corresponde ao principal catião no fluido extracelular (plasma e espaço intersticial), mantendo a concentração e o volume deste compartimento, sendo, por isso, o ião que mais contribui para a sua osmolalidade. (Gaw *et al.*, 2013; Sánchez and Godino, 2013; Strazzullo and Leclercq, 2014)

A regulação do sódio no organismo depende do equilíbrio entre a sua ingestão e eliminação. O excesso de sódio é eliminado pelo rim. No entanto, numa situação patológica, a eliminação poderá ser feita pelo trato gastrointestinal (vómitos). Além dos vómitos, a perda pode ocorrer numa situação de diarreia crónica ou excesso de ingestão de diuréticos, levando à diminuição de sódio (hiponatremia). (Strazzullo and Leclercq, 2014)

Por outro lado, existem situações que levam ao aumento do sódio (hipernatremia), como diabetes insipida ou o hiperaldosteronismo.

4.1.2. Potássio (K^+)

É o principal catião intracelular. As variações de concentração do potássio no plasma (apesar de existir em baixas concentrações neste fluido), são extremamente valorizáveis e podem, até, ser incompatíveis com a vida. (Gaw *et al.*, 2013)

Os valores de potássio são importantes para manter os valores de potencial de membrana. Nas células que podem ser excitadas, alterações nos valores plasmáticos pode levar à despolarização membranar, podendo, por exemplo, em termos cardíaco, levar a arritmias. (Gaw *et al.*, 2013; Nomura, Shoda and Uchida, 2019)

Aumentos de potássio (hipercaliémia) podem ser devido a insuficiência renal associado a uma diminuição da eliminação, aumento da ingestão, hemólise celular (células são destruídas e o potássio intracelular passa para o plasma). (Sánchez and Godino, 2013)

Diminuição de potássio (hipocaliémia) pode ser devido a diuréticos, vómitos, síndrome de Cushing.

4.1.3. Cloro (Cl^-)

É um dos principais aniões extracelulares, em que as variações plasmáticas estão, normalmente, de acordo com variações de sódio, sendo importante a sua determinação para calcular o hiato aniónico. (Burtis and Bruns, 2015)

Situações de hiperclorémia podem advir de desidratação, síndrome nefrótica e acidose metabólica. Por outro lado, a hipoclorémia pode resultar de perda excessiva por vómitos ou

diarreias prologadas. Pode ainda ser uma situação dilucional, em que há um aumento da ingestão de água, ficando os eletrólitos diluídos. (Sánchez and Godino, 2013)

4.1.4. Bicarbonato (HCO_3^-)

O bicarbonato um dos principais aniões extracelulares e importante regulador do equilíbrio ácido-base, atuando como um tampão, dado que se liga a H^+ , formando ácido carbónico, podendo depois ser convertido em água e dióxido de carbono, que é eliminado nos pulmões. Assim, numa situação em que haja o aumento de H^+ , ou seja, acidose metabólica (diminuição do pH), os níveis de bicarbonato diminuem. Pelo contrário, se aumentar o pH, ou seja, alcalose metabólica, há um aumento da concentração de bicarbonato. (Burtis and Bruns, 2015)

4.1.5. Osmolalidade

A determinação da osmolalidade permite avaliar o equilíbrio entre todos os componentes dos compartimentos intracelular e extracelular. Os principais intervenientes na osmolalidade sérica são o sódio, cloreto, glicose e ureia. (Burtis and Bruns, 2015)

Assim, após a determinação destes parâmetros, pode-se calcular o valor de osmolalidade através da seguinte fórmula:

$$\text{Osmolalidade Calculada (mOsm/L H}_2\text{O)} = 2 \times [\text{Na}^+](\text{mM}) + [\text{Ureia}](\text{mM}) + [\text{Glicose}](\text{mM})$$

4.2. Metabolismo Mineral

O metabolismo mineral permite a regulação do cálcio, fosfato e magnésio. A concentração destes elementos no plasma está diretamente relacionada com os mecanismos de deposição e reabsorção óssea, a absorção intestinal e a excreção renal.

4.2.1. Cálcio (Ca^{2+})

O esqueleto humano armazena cerca de 99% do cálcio do organismo. Em comparação, a quantidade presente no fluido extracelular é muito reduzida. O cálcio permite a sinalização celular, a permeabilidade membranar, a contração muscular e a coagulação. (Burtis and Bruns, 2015; Gaw *et al.*, 2013; Sánchez and Godino, 2013)

No plasma, o cálcio existe em 3 estados: livre, ligado a proteínas (principalmente a albumina) e complexado. O cálcio livre é a forma ativa deste elemento, sendo controlada pela hormona paratiroideia (PTH) e pela 1,25 di-hidroxicolecalciferol. (Burtis and Bruns, 2015)

Sendo que parte do cálcio está ligado à albumina, alterações deste analito podem resultar em valores alterados de cálcio, mas que não correspondem à situação real. Assim, quando há

diminuição nos valores de albumina, procede-se ao cálculo do “cálcio corrigido”, que permite obter um valor de cálcio caso a albumina estivesse dentro dos valores normais de referência, através da seguinte fórmula: (Gaw *et al.*, 2013)

$$\text{Cálcio total corrigido (mg/dL)} = \text{Cálcio total} + 0,84 (4 - \text{Albumina [g/dL]})$$

4.2.2. Fosfato (PO_4^{3-})

O fosfato existe em duas formas: orgânico e inorgânico. O fosfato orgânico existe em ácidos nucleicos, fosfolípidos e moléculas energéticas, como o ATP. O fosfato inorgânico é um dos principais componentes do osso (hidroxiapatite), sendo, importante na sua manutenção estrutural. (Burtis and Bruns, 2015; Christov and Jüppner, 2018)

A manutenção dos níveis de fosfato no plasma é conseguida pelo rim, através da sua reabsorção ou excreção, dependendo das necessidades do organismo. Assim, uma situação de falha renal, em que a excreção renal se encontra diminuída, pode levar a uma situação de hiperfosfatemia secundária. Uma situação de hiperfosfatemia pode advir de uma situação de hipoparatiroidismo, uma vez que a hormona paratiroideia diminui a excreção de fosfato no rim. Por outro lado, uma situação de hiperparatiroidismo leva uma situação de hipofosfatemia, uma vez que a excreção renal está aumentada. (Gaw *et al.*, 2013)

4.2.3. Magnésio (Mg^{2+})

O magnésio é um catião intracelular abundante, sendo extremamente importante como cofator de múltiplas enzimas, além de intervir em processos como a glicólise. Além disso, o magnésio inibe competitivamente a entrada de cálcio para as células neuronais, impedindo um excesso de excitabilidade. Portanto, uma situação de hipomagnesémia vai levar a um aumento da excitabilidade neuromuscular, dado que mais cálcio entra nas células. (Burtis and Bruns, 2015; Gaw *et al.*, 2013; Seitz *et al.*, 2014)

4.3. Função Hepática e Biliar

O fígado é um órgão extremamente importante, sendo que apresenta um elevado número de funções a nível fisiológico. Este órgão está envolvido nos processos digestão, através da produção de bÍlis, que vai emulsificar os lípidos da dieta e neutralizar o pH ácido do estômago. Por outro lado, constitui uma reserva energética ao armazenar o glicogénio proveniente da remoção de glicose na corrente sanguínea, mantendo os valores de glicémia dentro dos valores normais. Além disso, está também envolvido no metabolismo e excreção da bilirrubina, ou xenobióticos, por exemplo, fármacos. Por fim, uma função essencial é ainda a

síntese de novos compostos, como proteínas ou lípidos. (Burtis and Bruns, 2015; VanPutte, Regan and Russo, 2019)

Existem várias determinações que permitem avaliar a função hepática. As alterações mais frequentes que ocorrem são dano hepatocelular e colestase. Na lesão hepatocelular, é frequente analisar as aminotransferases (AST e ALT) e no caso de colestase, a fosfatase alcalina e gama-GT. Pode-se ainda avaliar a função hepática recorrendo-se à determinação da albumina e do tempo de protrombina.

4.3.1. Aminotransferases

As aminotransferases, tanto a alanina aminotransferase (ALT) como a aspartato aminotransferase (AST), são abundantemente produzidas pelos hepatócitos e libertadas em situação de lesão celular. Estas enzimas catalisam uma reação que consiste na transferência de um grupo amina do aminoácido (alanina e aspartato) para o α -cetogluturato, formando glutamato e oxaloacetato (AST) ou glutamato e piruvato (ALT). (Burtis and Bruns, 2015; Lee, Kim and Poterucha, 2012)

A AST existe em diversos órgãos, como o fígado, rim, coração, entre outros, enquanto que a ALT existe maioritariamente no fígado, sendo, então, uma enzima mais específica deste órgão do que a AST. (Lee, Kim and Poterucha, 2012)

Assim sendo, como a AST e a ALT são enzimas que existem no citosol dos hepatócitos, numa situação em que ocorra uma lesão hepatocelular elas vão ser libertadas para a corrente sanguínea. No entanto, devido às suas distribuições, a ALT é considerada um melhor biomarcador da lesão hepática. (Burtis and Bruns, 2015)

4.3.2. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) está vastamente distribuída por todo o organismo, mas existe de forma mais notória no intestino, rim, fígado, osso e placenta. (Burtis and Bruns, 2015)

Sendo que pode estar aumentada em situações de doenças ósseas, salienta-se a importância de determinar em paralelo os níveis de GGT, dado que se corresponder a uma patologia ao nível do osso, os valores de GGT não deverão estar aumentados. Tal não se verifica caso seja uma situação hepatobiliar, ou seja, colestase, em que tanto a ALP como a GGT deverão estar acima dos valores de referência. (Burtis and Bruns, 2015; Lee, Kim and Poterucha, 2012)

4.3.3. Gama Glutamil transferase

A gama glutamil transferase (GGT) é uma enzima que cataliza a reação de transferência do grupo gama glutamil de peptídeos para substratos como peptídeos ou aminoácidos. A GGT está presente nos túbulos proximais renais, fígado, pâncreas e ductos biliares.

A elevação dos valores de GGT sugere, principalmente, uma situação de colestase, em que há uma obstrução biliar, ou que existem hábitos de consumo excessivo de álcool. Contudo, esta enzima não é específica dos canalículos biliares. Assim, como pode acompanhar o aumento da concentração sérica da ALP, deve ser feita a determinação de ambas em simultâneo, podendo, deste modo, verificar a existência, ou não, de colestase. (Burtis and Bruns, 2015; Gaw *et al.*, 2013; Lee, Kim and Poterucha, 2012)

4.3.4. Bilirrubina

A bilirrubina é um pigmento resultante do metabolismo do grupo heme, essencialmente relacionado com a degradação eritrocitária, cujo tempo vida médio é cerca de 120 dias.

Quando há hemólise, a hemoglobina é degradada e o seu grupo heme é transformado em bilirrubina não conjugada. Como é insolúvel, na corrente sanguínea circula ligada à albumina, principalmente, sendo transportada até ao fígado, onde se desassocia desta proteína e no interior dos hepatócitos vai sofrer um processo de conjugação com ácido glucurónico. Esta bilirrubina conjugada já é solúvel, podendo ser transportada até aos canalículos biliares, sendo excretada com a bÍlis para o intestino. Aqui, vai ser convertida em urobilinogénio devido à microbiota bacteriana. Depois o urobilinogénio vai ser excretado nas fezes na forma de estercobilina, mas parte deste vai ser reabsorvido, entrando no circuito enterohepático. Assim, a maioria volta a ser excretada para o intestino e eliminado nas fezes, mas uma pequena parte entra na circulação geral, sendo eliminado pelo rim na urina sob a forma de urobilina. (Burtis and Bruns, 2015; Fevery, 2008; Gaw *et al.*, 2013)

Os aumentos de bilirrubina são denominados de hiperbilirrubinémia, podendo ser devido a bilirrubina conjugada ou não conjugada. A hiperbilirrubinémia pode ser, então, de causa pré hepática, hepática ou pós hepática. (Guerra Ruiz *et al.*, 2021)

Numa situação pré hepática, o aumento em questão deverá ser da bilirrubina não conjugada, em que a principal causa é o aumento de produção de bilirrubina devido a hemólise, que ultrapassa as capacidades de conjugação e excreção do fígado. (Burtis and Bruns, 2015)

Na hiperbilirrubinémia hepática, o aumento tanto pode ser de bilirrubina conjugada como de não conjugada, dado que a causa estará relacionada com a função hepática, quer seja na

captação da bilirrubina, quer seja na conjugação ou excreção. Isto pode ser devido quer a dano hepatocelular ou já uma situação de cirrose. (Guerra Ruiz *et al.*, 2021)

Por fim, pode ser uma hiperbilirrubinémia pós hepática, estando relacionada com a fração conjugada da bilirrubina. Este aumento advém de um processo colestático, que impede a excreção da biliar e, como tal, a bilirrubina vai acumular nos canalículos, tornando-se tóxica, o que leva ao aumento da GGT e ALP. (Guerra Ruiz *et al.*, 2021)

4.3.5. Proteínas Totais

A síntese proteica ocorre principalmente a nível do fígado, enquanto que a sua eliminação ocorre no rim. As proteínas mais pequenas são filtradas no glomérulo, caso a função renal esteja normal. Em situações de insuficiência renal, estas não vão ser eliminadas e, como tal, vão acumular no plasma. Assim, este parâmetro além de permitir a avaliação da capacidade de síntese do fígado, porque se estiverem diminuídas pode sinalizar uma situação de insuficiência hepática, permite ainda determinar o estado renal, nomeadamente a TFG. Portanto, alterações nos doseamentos das proteínas totais remete para a continuação do estudo, de modo a determinar qual a proteína responsável por esta variação. (Burtis and Bruns, 2015)

A principal proteína circulante no plasma é a albumina, como será referido mais à frente. (Burtis and Bruns, 2015)

4.3.6. Albumina

A albumina é a proteína mais abundante na corrente sanguínea e é produzida apenas pelo fígado. A albumina permite a manutenção da pressão oncótica no plasma, auxiliando a manter o volume intravascular. Em situações que esteja diminuída, os fluídos vão para o espaço extracelular, originando edema. Além disso, permite o transporte de moléculas, como a bilirrubina. (Burtis and Bruns, 2015; Jagdish, Maras and Sarin, 2021)

A diminuição da albumina no sangue (hipoalbuminémia) ocorre em várias situações como doença hepática, doença renal ou infeções. Sendo que a hipoalbuminémia pode ter várias causas, para ser relevante em termos de diagnóstico hepático encontra-se associada à determinação do tempo de protrombina, uma vez que a diminuição do TP sugere défice na síntese de proteínas, excluindo causas extra hepáticas para a diminuição da albumina. (Giannini, 2005)

Por outro lado, os aumentos de albumina (hiperalbuminémia) podem advir de situações de desidratação.

4.3.7. Tempo de Protrombina

Sendo o fígado o local de síntese dos fatores de coagulação que são avaliados com o tempo de protrombina (TP) (fibrinogénio, protrombina e fatores V, VII e X), a determinação deste parâmetro permite avaliar a função hepática.

Assim, um aumento no TP pode significar alterações hepáticas quando associado a hipoalbuminémia. No entanto, um TP aumentado pode, ainda, ser devido a um défice de vitamina K, que é importante na síntese de fatores de coagulação, pelo que se esta vitamina não está presente no organismo, não há a síntese dos fatores de coagulação, logo o TP aumenta. Este analito é realizado no setor de hematologia. (Burtis and Bruns, 2015)

4.4. Função Renal

Os rins são um importante regulador dos mecanismos de homeostase, através da regulação dos níveis hídricos e eletrólitos, bem como do equilíbrio ácido-base. Além disso, permitem a excreção de metabolitos, como creatinina ou ácido úrico, além de possuírem ainda uma função endócrina, através da produção de hormonas, entre as quais a renina e eritropoietina. (Burtis & Bruns, 2015)

4.4.1. Ureia

A ureia resulta do metabolismo de proteínas provenientes da alimentação, sendo sintetizada pelo fígado. A sua eliminação é feita na forma de uratos pelo rim onde são filtrados no glomérulo, sendo que a maior parte vai ser reabsorvida nos túbulos proximais. Apenas uma pequena parte do que foi inicialmente filtrado vai ser depois secretado pelos túbulos distais para posterior eliminação.

A ureia pode estar aumentada em situação de dietas ricas em proteína ou disfunção renal. Está diminuída em caso de falha hepática, por exemplo. (Burtis and Bruns, 2015; Gaw *et al.*, 2013)

4.4.2. Ácido Úrico

Composto azotado resultante do metabolismo de purinas (adenina e guanosina), formado essencialmente no fígado e excretado pelo rim. (Burtis and Bruns, 2015)

O doseamento do ácido úrico permite, além de avaliar a função renal, diagnosticar outras situações como gota. A sua monitorização é muito importante em doentes a fazer tratamento com quimioterapia citostática.

O aumento do ácido úrico, ou hiperuricemia, pode ser devido a um aumento na produção metabólica devido ao excesso de purinas, a uma diminuição da excreção renal ou uma combinação destes dois mecanismos como, por exemplo, dieta, diminuição da TGF e consumo de álcool, respetivamente. Por outro lado, a sua diminuição, ou hipouricemia, pode ocorrer devido a um défice na síntese de purinas, por exemplo. (Burtis and Bruns, 2015)

4.4.3. Creatinina

A creatinina é um produto metabólico resultante da degradação da creatina e fosfocreatina, essencialmente a nível muscular, e é excretada pelo rim na urina. Não sofre reabsorção tubular, mas uma pequena parte é secretada pelo túbulo proximal, o que aumenta à medida que a situação de insuficiência renal se agrava. (Huidobro E., Tagle and Guzmán, 2018)

Como a creatina existe no músculo, a sua produção está relacionada com a massa muscular de cada um, mas no soro a concentração é extremamente controlada através da filtração glomerular.

Apesar de ser representativo da TFG, pequenas diminuições dos valores de creatinina no soro não têm repercussões na TFG. Como tal, aliado a esta determinação realiza-se o cálculo da clearance da creatinina. (Gaw *et al.*, 2013)

CLEARANCE CREATININA (CrCl)

Dado que a creatinina é filtrada no glomérulo e não sofre reabsorção, a relação entre a produção e a sua eliminação deverá ser constante, permitindo avaliar o estado da filtração glomerular.

O cálculo da clearance de creatinina faz-se segundo a seguinte fórmula, com recurso ao doseamento da creatinina na urina, que deverá ser de 24h, e no soro: (Gaw *et al.*, 2013)

$$CrCl (ml/min) = \frac{\text{Creatinina na urina (mg/dL)} \times \text{Volume de urina das 24h (mL/min)}}{\text{Creatinina sérica (mg/dL)}}$$

4.4.4. Taxa de Filtração Glomerular

A taxa de filtração glomerular (TFG) é o volume de plasma filtrado pelo glomérulo por unidade de tempo, permitindo avaliar a função renal. (Gaw *et al.*, 2013)

Este parâmetro varia de acordo com algumas condições como sexo peso, raça e idade. Como tal, existem fórmulas de cálculo que têm este facto em consideração. Uma das formas de calcular a TFG é segundo a fórmula de Cockcroft-Gault: (Gaw *et al.*, 2013)

$$TFG(mL/min) = \frac{[140 - Idade (anos)] \times Peso (kg)}{72 \times \text{concentração sérica de creatinina (mg/dl)}}$$

No caso das mulheres:

$$TFG (mL/min) = \frac{[140 - Idade (anos)] \times Peso (kg)}{72 \times \text{concentração sérica de creatinina (mg/dl)}} \times 0,85$$

4.4.5. Proteinúria

A proteinúria consiste na excreção renal anormal de proteínas. Como já referido, as proteínas de baixo peso molecular são filtradas ao nível do glomérulo, sendo que a maioria volta a ser reabsorvida para a corrente sanguínea. Assim, os níveis de proteína na urina não são elevados numa situação normal.

A proteinúria pode ser causada por quatro mecanismos: dano glomerular, dano tubular, excesso de proteínas de baixo peso molecular ou proteinúria pós renal.

Na proteinúria glomerular há um aumento da permeabilidade da membrana do glomérulo que permite a passagem de proteínas maiores, como a albumina. Isto pode ocorrer devido a uma síndrome nefrótica, ou simplesmente devido a situações fisiológicas como exercício físico ou febre.

A proteinúria tubular leva ao aparecimento de proteínas de baixo peso molecular, como a α_1 -microglobulina, na urina, que numa situação normal iriam ser reabsorvidas no túbulo proximal. A principal causa desta ocorrência são distúrbios genéticos (Síndrome de Fanconi).

A proteinúria por excesso ocorre quando há um aumento de proteínas de baixo peso molecular, em que a capacidade de filtração glomerular excede a capacidade de reabsorção tubular, podendo encontrar-se na urina hemoglobina ou mioglobina, por exemplo.

Por fim, existe a proteinúria pós-renal, causada por danos ou inflamação do trato urinário inferior. (Burtis and Bruns, 2015)

4.4.6. Urina Tipo II ou Sumária de Urina

Para a análise da sumária de urina (ou urina tipo II), a amostra de eleição é a primeira da manhã, colhida para um recipiente limpo e seco, sendo que deve ser o mais rapidamente possível entregue no laboratório responsável para que seja acondicionada segundo critérios específicos para que não haja deterioração da amostra. (Medicine, 2000)

O processamento da urina passa por 3 etapas: exame macroscópico, exame físico-químico e exame microscópico do sedimento. (Medicine, 2000)

No **exame macroscópico**, analisa-se a cor, o aspeto e o odor. A **cor** pode ter um tom entre o amarelo claro e o laranja escuro. Esta tonalidade é devida à presença de urobilina, que é um produto final da degradação da bilirrubina. No entanto, pode ainda existir outras cores, por exemplo, avermelhado, o que sugere a presença de eritrócitos, que pode ser uma situação patológica. Em relação ao **aspeto**, uma urina fresca é límpida ou apenas apresenta uma ligeira turvação, sendo que se estiver durante algum tempo em repouso pode haver a deposição de muco, leucócitos, células e cristais. Caso a amostra seja refrigerada, isto pode levar ainda ao aumento da turvação e levar à precipitação de cristais, dado que há a diminuição da solubilidade. Por fim, analisa-se o **odor**, que normalmente é tolerável e característico.

De seguida procede-se à **análise físico-química** da urina, através de tiras químicas multiparamétricas, que permitem a análise de: pH, densidade, glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, hemoglobina, cetonas, nitritos e leucócitos. (Medicine, 2000)

Tabela 1. Parâmetros avaliados na sumária de urina e o seu significado clínico

Parâmetro	Significado Clínico
pH	O pH urinário pode variar entre 4,5 e 9,0, sendo que os valores normais são entre 5,5 e 6,5. Com este parâmetro consegue-se analisar a capacidade do rim manter o equilíbrio ácido-base. No caso de existirem bactérias que metabolizem a ureia, pode haver um aumento do pH urinário.
Densidade	A densidade está relacionada com a capacidade do rim concentrar ou diluir a urina. Os valores normais encontram-se entre 1,005 e 1,030.
Glicose	Numa pessoa sem nenhuma patologia associada, a glicose não aparece na urina, dado que é reabsorvida pelo próprio rim no túbulo proximal. No entanto, existe um limite diário de reabsorção. Assim, quando ocorrem situações de hiperglicémia elevada, ocorre glicosúria.
Proteínas	Na urina, caso existam, a concentração de proteínas é muito baixa, porque existe a filtração renal. Caso haja lesão renal, pode levar ao surgimento de proteinúria. Outras situações como febre e esforço físico intenso podem levar a que ocorra proteinúria. As tiras teste comumente utilizadas são mais sensíveis à albumina do que às restantes proteínas.
Bilirrubina	Na urina encontra-se na forma de bilirrubina conjugada (direta), isto é, na sua forma solúvel. Este é também um analito que não é encontrado na urina numa situação normal. Como tal, sempre que há a sua deteção, tem que ser considerada clinicamente.
Urobilinogénio	É um produto final do metabolismo da bilirrubina. Este é um indicador de que pode estar a ocorrer uma lesão hepática.
Hemoglobina/ Eritrócitos	A tira teste é mais sensível à hemoglobina (e mioglobina), logo se não houver hemólise, o resultado poderá ser negativo, mesmo estando presentes eritrócitos. Se o resultado for positivo, pode refletir danos renais, bem como situações fisiológicas, como o caso da menstruação em mulheres.
Corpos cetónicos	Normalmente não ocorrem na urina. Quando surgem na urina refletem a metabolização incompleta dos lípidos e estão associados a jejum prolongado ou cetoacidose diabética, por exemplo.
Nitritos	Caso haja a presença de nitritos na urina, reflete sempre uma infeção urinária, dado que algumas bactérias convertem os nitratos em nitritos.
Leucócitos	Pode sugerir uma situação de infeção urinária, podendo existir noutras situações.

Por fim, procede-se ao **exame microscópico**. Aqui analisa-se o sedimento urinário, ou seja, os eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros, muco, cristais, lípidos e microrganismos. (Medicine, 2000)

Tabela 2. Parâmetros avaliados no sedimento urinário e o seu significado clínico

Parâmetro	Significado Clínico
Eritrócitos	Podem ser encontrados frequentemente e são fortemente afetados pela densidade urinária (aumentam de tamanho com a diminuição da densidade da urina). Não sendo um contaminante, pode refletir doenças renais ou do trato urinário. Podem ter formas variadas, permitindo diferenciar a sua proveniência: eritrócitos isomórficos refletem hematúria não glomerular (do trato urinário inferior), enquanto que eritrócitos dimórficos sugerem hematúria glomerular (renal).
Células epiteliais de descamação	Células que recobrem as camadas superficiais do epitélio genital. São frequentes em amostras de mulheres e, em grandes quantidades, refletem uma má colheita de amostra.
Células epiteliais de transição	Provêm do epitélio renal desde os cálices até à bexiga nas mulheres e até à uretra proximal nos homens. Podendo ser das camadas superficiais e profundas, a prevalência de células das camadas profundas reflete uma situação mais grave, de urolitíase.
Células epiteliais renais tubulares	A presença na urina reflete danos nos túbulos renais.
Lípidos	Aparecem na urina quando ocorre danos na membrana do glomérulo, que permite a sua filtração.
Cilindros	São formados nos túbulos distais e ducto coletor devido à agregação de fibrilas da proteína de Tamm-Horsfall. A existência de cilindros reflete, normalmente, doença renal.
Muco	É uma secreção viscosa, com uma forma filamentosa, que pode, por vezes, ser confundido com cilindros hialinos.
Cristais	Derivam de compostos químicos da urina. Podem ou não ser clinicamente relevantes, sendo importante a avaliação em conjunto com a história clínica.
Microrganismos	Podem aparecer na urina bactérias, leveduras em que a mais comum é <i>Candida</i> spp. e parasitas, mais frequentemente <i>Trichomonas vaginalis</i> .

4.5. Função Cardíaca

Entre os distúrbios cardíacos, a doença isquémica aguda e a insuficiência cardíaca são os mais comuns.

É importante salientar que a doença isquémica aguda mais grave é o Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM), que ocorre quando o músculo cardíaco não é suficientemente oxigenado, originando danos ou mesmo morte celular. Nesta situação, vai haver a libertação de moléculas para a corrente sanguínea e, assim, o doseamento destes componentes é de extrema relevância, dado que muitas vezes o eletrocardiograma pode não apresentar quaisquer alterações.

4.5.1. Mioglobina

A mioglobina é uma proteína que transporta o oxigênio no músculo, quer seja esquelético ou cardíaco.

Esta proteína é dos primeiros marcadores a aparecer na corrente sanguínea, mas também são eliminados rapidamente. Além disso, não é específica do músculo cardíaco, podendo estar aumentada devido a destruição celular do músculo cardíaco ou mesmo em situações de insuficiência renal. Portanto, apesar de ser um biomarcador precoce, não permite aferir com certeza que está a ocorrer EAM em detrimento de outras causas, tendo uma janela de detecção muito curta. (Burtis and Bruns, 2015)

4.5.2. Creatina Cinase

A creatina cinase é uma enzima que cataliza a fosforilação da creatina no músculo. Tem diferentes isoformas que são mais específicas de certos tecidos: CK-MB existe principalmente no músculo cardíaco, CK-MM existe no músculo esquelético e CK-BB que existe no tecido cerebral. (Burtis and Bruns, 2015)

A CK-MB é uma isoforma que numa situação de enfarte do miocárdio vai ser libertada e vai aumentar precocemente na corrente sanguínea, cerca de 4 a 9 horas após o dano, atingindo o pico cerca de 24 horas depois. Volta aos valores normais após cerca de 48 horas. (Aydin et al., 2019)

Assim, este é um bom biomarcador para o diagnóstico precoce do EAM, aliado a outros marcadores.

4.5.3. Peptídeo Natriurético B

O peptídeo natriurético tipo B (BNP) é uma hormona sintetizada pelos cardiomiócitos em situação de dano celular cardíaco, em que há uma sobrecarga de volume e pressão no coração. Este é sintetizado na forma de pro-hormona, sendo depois clivado em BNP, a forma ativa, e NT-proBNP.

NT-proBNP é eliminado pela via renal e tem uma semi-vida maior do que o BNP, sendo, também, mais estável. Como tal, é mais frequente realizar o doseamento dos níveis de NT-proBNP no sangue para o rápido diagnóstico de insuficiência cardíaca. (Gaggin and Januzzi, 2013; Hall, 2004)

4.5.4. Troponinas Cardíacas

As troponinas são proteínas que existem nos cardiomiócitos e são libertadas para o sangue em situações de necrose, sendo um biomarcador sensível de dano cardíaco, dado que são estruturalmente diferentes das isoformas presentes no músculo esquelético. No tecido cardíaco existem dois tipos de troponinas específicas: troponina I (cTnI) e troponina T (cTnT), e têm a função de permitir a contração muscular. Estas troponinas são detetáveis pouco tempo após o evento cardíaco (cerca de 4-8 horas), atingindo o pico 12 horas após e mantêm-se elevadas durante uma a duas semanas. (Burtis and Bruns, 2015; Gaw *et al.*, 2013)

No entanto, apesar da sua sensibilidade e especificidade, podem encontrar-se elevadas devido a outras situações como miocardites ou mesmo em casos de sépsis severa. Assim, é importante avaliar este parâmetro juntamente com os outros biomarcadores, já referidos anteriormente, e também segundo a situação clínica. (Gaw *et al.*, 2013)

4.6. Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos são moléculas hidrofóbicas solúveis em solventes orgânicos. Os lípidos têm diversas funções no organismo, como: manutenção da integridade das membranas celulares, reserva energética, além de intervirem no processo digestivo. (Burtis and Bruns, 2015)

Na corrente sanguínea circulam associados às lipoproteínas, complexos macromoleculares, cuja função é o transporte dos lípidos. As lipoproteínas têm uma superfície hidrofílica, constituída pelas porções polares dos fosfolípidos e colesterol livre, e um interior hidrofóbico, constituído por colesterol esterificado e as porções apolares dos fosfolípidos. À sua superfície contém, ainda, apoproteínas. (Burtis and Bruns, 2015)

Existem diferentes classes de lipoproteínas: quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). (Gaw *et al.*, 2013)

É importante a monitorização dos níveis lípidos devido à sua associação à aterosclerose, uma das principais causas de doenças cardiovasculares. A aterosclerose é um processo inflamatório crónico em que há a invasão das LDL (constituído principalmente por colesterol) na parede arterial, fazendo com que haja o recrutamento de monócitos para o tecido, onde se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos vão acumular o colesterol e, posteriormente, formar a placa aterosclerótica. (Burtis and Bruns, 2015)

4.6.1. Colesterol Total

O colesterol é essencialmente produzido no fígado, sendo apenas que apenas 15% deriva da dieta. (VanPutte, Regan and Russo, 2019) É um importante constituinte das membranas celulares, além de estar envolvido na síntese de hormonas esteróides e de ácidos biliares. (Gaw *et al.*, 2013)

Apesar de ser importante para o funcionamento do organismo, níveis elevados de colesterol são prejudiciais à saúde. Como tal, tem que haver uma regulação entre a produção e eliminação deste lípido.

4.6.2. Colesterol HDL

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são as responsáveis pelo transporte do colesterol desde as células periféricas até aos hepatócitos, sendo eliminado na biliar, o chamado transporte reverso do colesterol. Assim, as HDL produzem um efeito protetor no organismo, impedindo a acumulação de colesterol no organismo. Como tal, níveis mais elevados de HDL estão relacionados com uma redução no risco de DCV. (Burtis and Bruns, 2015; VanPutte, Regan and Russo, 2019)

4.6.3. Colesterol LDL

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) derivam das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). As VLDL transportam os triglicerídeos do fígado até aos tecidos, onde vão sendo hidrolisados, formando LDL. Portanto, a quantidade de LDL em circulação está intimamente relacionada com os níveis de VLDL no sangue. No entanto, quando há excesso de LDL que não é necessário às células, estas vão inibir a síntese de recetores de LDL, pelo que vão permanecer na corrente sanguínea. (Burtis and Bruns, 2015)

Como já referido, as LDL são as principais intervenientes no processo de aterosclerose. Devido ao seu tamanho, mais facilmente conseguem entrar nas artérias, onde são oxidadas, havendo, posteriormente, a formação de placas ateroscleróticas. Deste modo, ao contrário das HDL, níveis elevados de LDL estão relacionados com aumento do risco de DCV. (Burtis and Bruns, 2015)

4.6.4. Triglicerídeos

Os triglicerídeos são constituídos por três moléculas de ácidos gordos e uma de glicerol. Constitui a principal reserva lipídica no tecido adiposo. (VanPutte, Regan and Russo, 2019)

Os triglicerídeos são os principais lípidos da dieta. Como tal, após uma refeição vão ser metabolizados, sendo transportados nas VLDL, que como já referido, vão originar as LDL. Assim, um aumento dos triglicerídeos está relacionado com o aumento do risco de DCV. (Lieberman and Peet, 2018)

4.7. Outros Doseamentos

4.7.1. Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda positiva produzida no fígado, sendo um marcador de inflamação/infeção. Os níveis de PCR aumentam 6 a 12 horas após o estímulo inicial, atingindo o pico por volta das 48 horas. Os níveis ligeiramente elevados de PCR também estão relacionados com aumento do risco de DCV. No entanto, para esta deteção destes níveis inferiores aos casos de infeção, recorre-se a técnicas de PCR de alta sensibilidade (hs-PCR). (Burtis and Bruns, 2015)

4.7.2. Glicose

A glicose é um hidrato de carbono e representa a principal fonte de energia do organismo. Pode ser proveniente da dieta ou sintetizada no fígado numa situação de jejum. Os níveis de glicose no sangue, ou seja, a glicémia, é mantida pela ação de hormonas produzidas no pâncreas: insulina e glucagina.

Após uma refeição, há a produção de insulina o que vai permitir a captação da glicose da corrente sanguínea para ser metabolizada. No entanto, numa situação de Diabetes mellitus, que é a situação patológica mais frequente associada ao metabolismo da glicose, não vai haver a captação da glicose, originando hiperglicémia. Isto ocorre porque ou o organismo não produz insulina ou é resistente à insulina que produz. (Burtis and Bruns, 2015; Gaw *et al.*, 2013)

Segundo a Norma n.º 002/2011 da Direção Geral da Saúde, o diagnóstico de diabetes mellitus é feito segundo a confirmação de pelo menos um dos seguintes critérios:

- a. Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl
- b. Sintomas clássicos com glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl
- c. Glicémia ≥ 200 mg/dl às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO)
- d. Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

4.7.3. Hemoglobina Glicada

O doseamento da hemoglobina glicada permite além do diagnóstico, a monitorização da diabetes. A hemoglobina glicada forma-se através da ligação irreversível da glucose às cadeias beta da hemoglobina. Assim, a formação da hemoglobina glicada está relacionada com a semivida eritrocitária, daí que represente os valores de glicémia dos últimos 3 meses. (Burtis and Bruns, 2015)

4.7.4. Lactato Desidrogenase

A lactato desidrogenase é uma enzima que catalisa a redução do piruvato a lactato. Esta enzima não é específica de nenhum tecido, estando distribuída pelo organismo. Sendo que é uma enzima intracelular, situações que levem a destruição celular vão levar ao seu aumento sérico. Exemplos destas situações são EAM e hemólise. Assim, como não está restrita a um órgão, apenas é utilizada como um marcador de lesão tecidual, sem especificidade de órgão. (Burtis and Bruns, 2015)

4.7.5. α -Amílase

A amílase é uma enzima digestiva, importante na digestão do amido, produzida principalmente pelas glândulas salivares, amílase salivar, e pelo pâncreas, amílase pancreática. Além de existir na saliva e no pâncreas em maiores quantidades, está também presente noutros órgãos. Numa situação fisiológica pode ser encontrada na urina.

Está elevada em situações de pancreatite aguda, 5 a 8 horas após a primeira sintomatologia, com pico entre as 12 e 78 horas. No entanto, esta não é uma enzima específica de pancreatite, podendo estar elevada noutras situações, como doença biliar, obstrução intestinal ou insuficiência renal. (Burtis and Bruns, 2015; Lieberman and Peet, 2018)

4.7.6. Lípase

Lípase é uma enzima produzida principalmente no pâncreas, importante para a digestão dos triglicerídeos.

Os níveis de lípase aumentam ao mesmo tempo do que os da amílase, mas permanecem elevados durante mais tempo, por isso aumentos de lípase são mais específicos de pancreatite. Isto deve-se ao facto de a lípase, ao contrário da amílase, não ser eliminada na urina. (Burtis and Bruns, 2015; Lieberman and Peet, 2018)

4.8. Metodologias

No setor de Bioquímica Clínica, as principais determinações são feitas em aparelhos automáticos da Abbott, os *Alinity c* e *Alinity i*. Os *Alinity c* realizam os doseamentos analíticos segundo técnicas de espectrofotometria, turbidimetria, potenciometria, enquanto que os *Alinity i* para a realização de imunoenaios utilizam métodos de quimioluminescência.

4.8.1. Espectrofotometria

A técnica de espectrofotometria consiste na medição da intensidade de luz, onde uma fonte luminosa faz incidir um raio de luz com um comprimento de onda específico na amostra e, caso a amostra tenha os componentes que absorvem a luz no comprimento de onda selecionado, a intensidade de luz que atinge o detetor vai diminuir. Assim, pode-se determinar a concentração do analito, dado que, segundo a Lei de Beer, a concentração do analito é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida ou inversamente proporcional ao logaritmo da luz transmitida. (Burtis and Bruns, 2015)

4.8.2. Turbidimetria

A turbidimetria é uma técnica que mede a quantidade de luz dispersada. Esta dispersão ocorre quando a luz incide na amostra e encontra uma molécula que impede a sua passagem, fazendo com que seja dispersada em várias direções. Assim, a turbidez da amostra diminui a intensidade de luz transmitida. No entanto, esta técnica tem alguns interferentes como o tamanho e a concentração das partículas em suspensão, bem como o seu peso molecular. (Burtis and Bruns, 2015)

4.8.3. Potenciometria

A potenciometria é uma técnica baseada na medição da diferença de potencial elétrica entre dois elétrodos numa célula eletroquímica. Estes dois elétrodos são diferentes: um é um eletrodo de referência, em que o potencial não varia, enquanto que o segundo é um eletrodo seletivo para um analito. Quando o eletrodo seletivo entra em contacto com a amostra vai alterar o potencial, se estiver na presença do analito em estudo. O potencial medido está relacionado com a atividade do ião em estudo. (Burtis and Bruns, 2015)

4.8.4. Quimioluminescência

A quimioluminescência é a emissão de luz por um eletrão quando este volta de um estado excitado a um estado mais baixo de energia. A quantidade de luz emitida está diretamente

relacionada com a concentração do analito em questão. Nesta metodologia, é adicionado primeiramente um anticorpo à amostra e depois adiciona-se um anticorpo marcado com partículas luminescentes. Este segundo anticorpo marcado vai-se ligar ao complexo formado inicialmente e quando se adiciona o composto orgânico vai fazer com que se emita luz, que é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra. (Burtis and Bruns, 2015)

5. IMUNOLOGIA

A imunidade é um mecanismo que o nosso organismo apresenta para nos proteger contra agentes externos. Assim, a imunologia dedica-se ao estudo de doenças que afetam o nosso sistema imunológico, nomeadamente as doenças autoimunes e alérgicas.

O setor de imunologia encontra-se dividido em duas áreas: imunologia e autoimunidade. Aqui, as amostras mais utilizadas são o soro, urina e LCR.

No laboratório de imunologia, a análise mais frequente é o doseamento das imunoglobulinas. Também se faz um proteinograma (com a albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama globulinas), que permite detetar alterações proteicas, caso existam. Sempre que se verifique alguma alteração nas gama globulinas, de seguida realiza-se uma imunofixação para identificar qual a imunoglobulina alterada, quer sejam cadeias pesadas (G, A, M, D ou E) ou leves (kappa ou lambda), podendo existir outras patologias, associadas às outras frações do proteinograma.

É ainda realizado o estudo de possíveis alergias, através da pesquisa de IgE específica por um método de imunoensaio fluoroenzimático (FEIA). Na Tabela 3 encontram-se as metodologias utilizadas na área de imunologia, bem como alguns exemplos de análises realizadas.

Tabela 3. Metodologias e Análises, alguns exemplos- área de Imunologia

Metodologia	Análise
Turbidimetria	IgA; IgM; IgG; Cadeias leves livres; Complemento CH50.
Nefelometria	Albumina (soro e LCR); Fator reumatoide; IgD; Subclasses IgG; Cadeias leves na urina; IgG no LCR.
Eletroforese Capilar	Proteínas séricas.
Imunofixação	Pesquisa e caracterização de bandas monoclonais; caracterização proteinúria.
ELISA	Elastase fecal; Atividade funcional do inibidor do CI.
FEIA	IgE específica; Triptase.
LC-MS/MS	Everolimus
Imunodifusão Radial	C2; C5.
Técnicas Manuais	Reação de Waaler-Rose; Crioglobulinas.

Na área de autoimunidade, o foco encontra-se na pesquisa de autoanticorpos que levam ao surgimento de doenças autoimunes. Assim, as doenças autoimunes são patologias que ocorrem quando o organismo perde a tolerância ao próprio sistema imune.

Na Tabela 4 encontram-se as metodologias utilizadas nesta área, bem como alguns exemplos de análises realizadas.

Tabela 4. Metodologias e Análises, alguns exemplos- área de Autoimunidade

Metodologia	Análise
Imunofluorescência Indireta	Anticorpos anti-nucleares; Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo; anticorpos associados a patologias hepáticas.
FEIA	Anticorpos anti-dsDNA; anticorpos anti-Transglutaminase tecidual (IgA e IgG) e anticorpos anti-Gliadina (IgA e IgG).
Quimioluminescência	Anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA); Anticorpos anti-membrana basal glomerular; Anticorpos anti-fator Fator intrínseco.
Immunoblotting	Anticorpos associados a doença hepática; anticorpos associados a miosites.
Radioimunoensaio	Anticorpos anti-insulina; Anticorpos anti-dsDNA.

6. HEMATOLOGIA

A área da hematologia dedica-se ao estudo dos constituintes sanguíneos e da medula óssea. Aqui a amostra biológica mais utilizada é o sangue, em que a colheita é feita para tubos de EDTA ou citrato.

O tubo de EDTA é utilizado para o estudo do hemograma, que permite a quantificação dos eritrócitos e os parâmetros associados (hemoglobina, volume globular médio, hemoglobina globular média, concentração média da hemoglobina globular, distribuição do diâmetro dos eritrócitos), contagem de plaquetas e leucócitos. O hemograma pode ser pedido com leucograma, que permite a contagem diferencial das subpopulações de leucócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos). Em certas situações pode ser pedido também a contagem de reticulócitos, especialmente em situações de anemia. Em situações que englobem alterações, é feito seguidamente um esfregaço sanguíneo corado pela Técnica de May-Grumwald-Giemsa que é observado ao microscópico ótico.

A área da hemostase utiliza o tubo de citrato para realizar as provas de coagulação. Neste caso é especialmente importante respeitar a proporção citrato: amostra, de 1:9, dado que volumes incorretos podem falsear os resultados. Nesta valência, as provas mais frequentemente pedidas são o Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (aPTT).

Por fim, existe um terceiro setor correspondente à área da citogenética, que recorre a amostras de sangue periférico ou medula óssea para a análise, por citogenética convencional (cariótipo) e citogenética molecular (*fluorescent in situ hybridization*- FISH), onde, a existirem, se observam as alterações cromossómicas que estão associadas a doenças hematológicas.

7. MICROBIOLOGIA

A microbiologia é o estudo dos microrganismos vivos, desde os visíveis macroscopicamente, até aos microrganismos.

O setor de microbiologia do CHUC encontra-se subdividido nas áreas de: bacteriologia, micobacteriologia, micologia, virologia e parasitologia.

7.1. Bacteriologia

As bactérias são organismos procarióticos, com uma estrutura simples. No entanto, têm uma parede celular complexa, que pode ter dois tipos de composições: uma camada de peptidoglicano espessa ou uma camada de peptidoglicano fina e com uma membrana extracelular a revestir. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016) Estas características estruturais vão ser importantes para a sua distinção, essencialmente no momento da coloração, como será abordado mais à frente.

Fisiologicamente, somos colonizados por diversos microrganismos, desde na pele, intestinos até ao trato geniturinário, constituindo uma microbiota normal, não patogénica. No entanto, podemos ser colonizados por outras bactérias patogénicas ou até mesmo, numa situação de debilidade imunológica, as mesmas bactérias que numa situação normal não provocam doença, podem tornar-se patogénicas oportunistas. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

O diagnóstico bacteriológico permite identificar o patogéneo causador da doença infecciosa, tendo que se ter sempre em mente qual a microbiota normal associada ao local da amostra.

7.1.1. Exame Microscópico

O exame microscópico permite determinar a qualidade de certas amostras, como expetorações, por exemplo, e, além disso, orienta uma possível identificação do agente patogénico. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

O exame microscópico pode-se realizar por dois métodos: por exame direto ou após coloração diferencial. O exame direto consiste na preparação de uma suspensão da amostra numa gota de soro fisiológico ou água, permitindo avaliar a presença de microrganismos ou

células. Por outro lado, pode-se realizar uma coloração, sendo que a usada com mais frequência é a Coloração de Gram. Após a fixação da amostra, esta é sujeita à ação de um primeiro corante, o cristal de violeta, e um mordente, o soluto de lugol. Depois adiciona-se um diferenciador, o álcool-acetona e, por fim, um segundo corante, a safranina ou fucsina. Esta coloração permite distinguir grupos de bactérias segundo a composição da parede celular. As bactérias com uma camada espessa de peptidoglicano conseguem resistir à ação do diferenciador, retendo o primeiro corante, pelo que são denominadas bactérias de Gram positivo. Por outro lado, as bactérias com uma camada de peptidoglicano fina e uma bicamada lipídica são suscetíveis à ação do diferenciador, pelo que vão ser coradas pelo segundo corante, sendo denominadas bactérias de Gram negativo. Além disso, é ainda possível distinguir a sua morfologia, se são cocos ou bacilos, e qual o seu agrupamento, em forma de cacho, em cadeia, tetrada, entre outros. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016)

7.1.2. Cultura

O exame cultural depende da origem da amostra, bem como da orientação fornecida pelo médico. Este procedimento permite o crescimento bacteriano, e posteriormente, o seu isolamento, para que seja possível a sua identificação, bem como a realização dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

Para o crescimento bacteriano existem diversos meios de cultura, podendo ser classificados como meios de enriquecimento, meios seletivos ou meios diferenciais. Consoante o seu estado, podem ser líquidos ou sólidos. Os meios de enriquecimento permitem o crescimento da maioria dos organismos não fastidiosos. Já os meios seletivos, pela sua composição em inibidores de crescimento, permitem o crescimento de bactérias específicas em detrimento de outras. Por fim, existem os meios diferenciais que permitem a identificação microbiana de acordo com as suas características, através da adição ao meio de componentes como lactose e indicadores de pH para a deteção da fermentação da lactose, por exemplo. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016) Os meios de cultura utilizados no setor de microbiologia encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Meios de Cultura utilizados no setor de Microbiologia

	Meio	Características
Líquido	BHI (Brain Heart Infusion)	Caldo de enriquecimento não seletivo que permite o crescimento de microrganismos fastidiosos. (Fonseca et al., 2004; Forbes et al., 2007)
	CM (Cooked Meat)	Caldo de enriquecimento para recuperação de bactérias anaeróbias, por ser rico em proteínas. (Jorgensen e Pfaller, 2015)
	CBGN (Caldo de Bacilos Gram negativo)	Caldo de enriquecimento seletivo para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Tem citrato e sai biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram positivo e ainda manitol, que é metabolizado pela <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. (Fonseca et al., 2004; Forbes et al., 2007)
	GS (Gelose de Sangue)	Meio de enriquecimento não seletivo. Permite diferenciar microrganismos com base na hemólise que apresentam. (Forbes et al., 2007)
	PVX (Gelose de Chocolate PolyViteX)	Meio de enriquecimento não seletivo. A gelose de chocolate é uma modificação da gelose de sangue: sangue é adicionado a um meio basal aquecido, levando à lise dos eritrócitos. Isto permite a libertação dos fatores V e X. Permite o crescimento de bactérias mais fastidiosas como <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Neisseria</i> spp. (Fonseca et al., 2004; Murray et al., 2016)
	MH (Mueller-Hinton)	Meio não seletivo utilizado para os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. (Murray et al., 2016)
	MH-F (Mueller-Hinton Chocolate)	Meio mais seletivo que o MH, utilizado para os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias mais fastidiosas.
Sólido	Tripticase de Soja	Meio não seletivo usado para controlo de antibiograma. (Jorgensen e Pfaller, 2015)
	CLED (Cistina-Lactose - Deficiente de Eletrólitos)	Meio não seletivo diferencial usado nas culturas de urina. Por ser deficiente em eletrólitos inibe o swarming provocado por <i>Proteus</i> spp. Tem lactose, o que permite diferenciar fermentadores e não fermentadores. (Fonseca et al., 2004)
	Hektoen	Meio seletivo e diferencial para o crescimento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Tem sais biliares que impedem o crescimento de bactérias Gram positivo e dificultam o crescimento de <i>Enterobacteriaceae</i> . Tem lactose, logo os fermentadores vão levar à diminuição do pH, pelo que o indicador de pH (azul de bromotimol) muda de cor. Tanto a <i>Salmonella</i> spp. como a <i>Shigella</i> spp. não são fermentadoras. Além disso, tem citrato férrico amoniacal, que permite observar a formação de H ₂ S, característico, por exemplo, de <i>Salmonella</i> spp. (Fonseca et al., 2004; Forbes et al., 2007)
	SS (<i>Salmonella Shigella</i>)	Meio seletivo diferencial para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. Tem sais biliares que inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo; lactose em que os fermentadores e não fermentadores são distinguidos através da mudança de cor do indicador de pH (vermelho neutro) e tem citrato férrico amoniacal, que permite observar a formação de H ₂ S, característico, por exemplo, de <i>Salmonella</i> spp. (Fonseca et al., 2004; Forbes et al., 2007)

HAE (Meio para <i>Haemophilus</i>)	Meio seletivo para <i>Haemophilus spp.</i> É constituído por uma gelose de chocolate suplementada com bacitracina, que inibe o crescimento de bactérias Gram positivo. (Fonseca et al., 2004)
VCAT (Meio para <i>Neisseria</i>)	Meio seletivo para <i>Neisseria spp.</i> É constituído por uma gelose de chocolate suplementada com vancomicina, colistina, anfotericina e Trimetoprim, que inibem o crescimento de bactérias Gram negativo, bactérias Gram positivo e leveduras. (Fonseca et al., 2004)
SGC2 (Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol)	Meio seletivo para isolamento de fungos. Tem cloranfenicol e Gentamicina que inibe o crescimento bacteriano. (Jorgensen e Pfaller, 2015)
CIN	Meio seletivo para <i>Yersinia spp.</i> Tem cefsulodina e novobiocina, sais biliares e cristal violeta que inibem as bactérias Gram positivo, Gram negativo e bactérias da microbiota gastrointestinal. Tem manitol que permite diferenciar os fermentadores através do indicador de pH (vermelho neutro). (Forbes et al., 2007)
CNA (Gelose COLUMBIA com sangue, colistina e ácido nalidixico)	Meio seletivo para bactérias de Gram positivo (cocos). A colistina e ácido nalidixico impedem o crescimento de <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Pseudomonas</i> . (Fonseca et al., 2004)
BCSA	Meio seletivo para o isolamento de <i>Burkholderia cepacia</i> .
CAM	Meio seletivo usado no isolamento de <i>Campylobacter spp.</i> Tem antibióticos (vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B e cefalotina) que inibem as bactérias Gram positivos a maioria das bactérias Gram negativo. (Jorgensen e Pfaller, 2015)

• TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO

Existem diversas metodologias para a inoculação dos meios de cultura. As utilizadas no setor de bacteriologia encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Técnicas de Sementeira utilizadas no setor de Bacteriologia

Técnica	Descrição
Semi-quantitativa	Inoculação feita com ança calibrada de 1 µL para quantificar o número de colónias formadas. Utilizada em amostras de urina.
Esgotamento	Inoculação feita com uma ança de modo a obter colónias isoladas. Utilizada na inoculação da maioria dos produtos biológicos em meio sólido.
Rolamento	Inoculação feita através do rolamento do cateter diretamente no meio.
Toalha	Inoculação feita com uma zaragatoa de modo a se obter um crescimento homogéneo. Utilizada na realização de antibiogramas.
Inundação	Inoculação direta de LCR nos meios, devido à baixa concentração de microrganismos, que a existirem são sempre valorizados.
Dispersão	Inoculação de meios líquidos para crescimento e recuperação de microrganismos.

• INCUBAÇÃO DAS CULTURAS

Para um crescimento bacteriano ótimo, as condições de incubação têm que ser as adequadas. Como tal, há que se ter em consideração a disponibilidade tanto de dióxido de carbono como de oxigénio, além da temperatura, pH e humidade do meio.

Tendo em conta a utilização de oxigénio, as bactérias podem ser aeróbicas, anaeróbias ou anaeróbias facultativas. A maioria das bactérias com significado clínico são anaeróbias facultativa, isto é, conseguem crescer tanto na presença (aerobiose) ou na ausência (anaerobiose) de oxigénio. Existem outros microrganismos que são estritamente aeróbios, não crescendo na ausência de oxigénio. Podem ainda ocorrer bactérias que apenas precisam de baixas quantidades de oxigénio, sendo estas denominadas microaerófilas. Por outro lado, as bactérias anaeróbias não crescem na presença de oxigénio.

Quanto há disponibilidade de dióxido de carbono, existem bactérias que para o seu crescimento necessitam de concentrações entre 5 a 10% de CO₂, denominadas de capnofílicas.

Relativamente à temperatura de incubação, a maioria das bactérias cresce melhor à temperatura corporal interna, pelo que a incubação é feita num intervalo de 35 a 37°C. No entanto, existem bactérias cuja temperatura favorável é cerca de 30°C e outras é de 42°C, como o *Campylobacter jejuni*.

O pH adequado ao crescimento da maioria das bactérias é entre 6,5 e 7,5, ou seja, é um pH neutro. Os meios de cultura são comercializados com o pH neste intervalo de valores.

Outra condição importante a ter em conta é a humidade, uma vez que a água é necessária nos processos metabólicos e, além disso, evita a lise celular por impedir que ocorra choque osmótico.

Por fim, a duração da incubação é, na maioria das situações, entre 24 a 48 horas. (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007)

7.1.3. Identificação

Segundo as características fenotípicas das colónias nos meios de cultura, pode-se realizar uma identificação presuntiva. No entanto, a identificação definitiva é realizada por MALDI-TOF MS, uma técnica de espetrometria de massa, no sistema automático MALDI Biotyper[®]. Nesta metodologia, a colónia isolada para identificação é colocada numa placa e adiciona-se uma matriz que vai permitir a dessorção e ionização pelo laser no aparelho. Neste ponto, as moléculas ionizadas vão migrar em direção ao detetor de iões e, como têm diferentes massas e cargas, vão ter diferentes velocidades. Assim, o detetor vai registar a quantidade de iões com diferentes cargas/massas que se formaram, traduzindo esta informação num espetro.

Cada espécie microbiana tem um espectro de massa característico e, como tal, o aparelho compara o espectro obtido na análise com a base de dados, permitindo a identificação bacteriana. (Patel, 2015)

7.1.4. Testes de Suscetibilidade ao Antimicrobianos

Após a identificação da bactéria, é realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), de modo a se poder verificar se existem, ou não, resistências aos fármacos, de modo a administrar uma terapêutica adequada ao paciente. Os resultados obtidos são interpretados de acordo com as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Na Europa, as recomendações seguidas são as EUCAST.

- **TSA Manual**

A realização do TSA inicia-se com a preparação do inóculo: faz-se uma suspensão de colónias iguais isoladas da cultura em soro fisiológico, de modo a que atinja uma turbidez equivalente a 0,5 McFarland. De seguida, e na maioria das situações, é feita a inoculação através da sementeira em toalha no meio de Mueller-Hinton. No entanto, no caso de bactérias mais fastidiosas, a inoculação é feita no meio de Mueller-Hinton chocolate. Por fim, adicionam-se os antibióticos ao meio, podendo ser realizado por duas técnicas: difusão em disco ou tira E-test. As placas são incubadas a 35°C durante 18-24 horas, no caso da maioria das espécies.

A difusão em disco é baseada no método de Kirby-Bauer, em que os discos impregnados com o antibiótico são aplicados na placa. No momento em que se aplica o disco, inicia-se a difusão do antibiótico no meio, estabelecendo-se um gradiente de concentração. Após a incubação do meio, é possível medir os halos de inibição em milímetros, o que vai permitir caracterizar a bactéria como suscetível, intermédia ou resistente ao antimicrobiano, de acordo com as recomendações.

O processo de E-test é semelhante à difusão em disco. No entanto, em vez de se usar discos com antibiótico, as tiras têm concentrações graduais de antibiótico, o que vai permitir a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI). Após a incubação do meio, verifica-se o crescimento bacteriano, em que a inibição apresenta a forma de uma elipse. Neste caso, a CMI é determinada na zona de interceção da base da elipse com a tira. (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Jorgensen and Ferraro, 2009)

- **TSA Automático**

O TSA automático é realizado no equipamento MicroScan WalkAway. Para este equipamento estão predefinidos painéis de antibióticos consoante o grupo bacteriano identificado. As placas de inoculação contêm diversos antibióticos com diferentes concentrações e dois poços de controlo que permitem validar o ensaio se houver crescimento. A amostra é inoculada nesta placa e vai ser incubada no equipamento, que faz uma leitura inicial, repetindo-as no tempo para avaliar o crescimento das bactérias, através da deteção por um fotómetro ou fluorímetro. A concentração mais baixa que inibe o crescimento bacteriano é a denominada concentração mínima inibitória (CMI). (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Jorgensen and Ferraro, 2009)

Adicionalmente, para o controlo da suspensão de inoculação bacteriana, esta é inoculada, também, em meio de tripticase de soja ou, no caso de organismos fastidiosos, em tripticase de soja com sangue.

7.1.5. Amostras

- **Sangue**

A presença de bactérias no sangue é denominada de bacteriémia. (Nester *et al.*, 2012)

Sendo o sangue um líquido estéril, qualquer organismo que cresça em cultura é valorizável. No entanto, há a possibilidade de algumas hemoculturas positivas serem devido a contaminações, isto é, por exemplo, se no momento da colheita, a desinfeção da pele não foi realizada corretamente, levando à contaminação da amostra com flora comensal da pele. Após a escolha da veia para a punção venosa é realizada a desinfeção do local e procede-se à colheita da amostra para os frascos de hemocultura, sendo colhidas 2 a 3 amostras em locais diferentes para garrafas de hemocultura diferentes. O volume colhido, no caso dos adultos deverá ser entre 10 a 30 mL, enquanto que na população pediátrica deve ser adequado ao seu peso, não devendo exceder os 5 mL. (Fonseca *et al.*, 2004)

A casa comercial que fornece os meios de cultura BACT/ALERT® sugere a colheita de 10 mL, no caso dos adultos, e 4 mL, em casos pediátricos.

Os frascos de hemocultura são depois introduzidos no equipamento BACT/ALERT®, sendo incubados a 37°C. Aqui, é feita uma monitorização contínua das hemoculturas de modo a verificar o crescimento bacteriano, através da leitura de um sensor que se encontra na base da garrafa que é sensível a alterações de concentração de CO₂. Quando há crescimento bacteriano, há a produção de dióxido de carbono e, como tal, o pH do meio diminui, levando à alteração do sensor que vai ser detetada pelo equipamento. Se ao fim de 5 dias não se verificar crescimento na hemocultura as amostras são consideradas como negativas.

As culturas positivas são depois repicadas para GS e realiza-se um esfregaço para coloração de Gram. O meio GS é incubado a 37°C, durante 24 a 48 horas. Se não houver crescimento, faz-se outra repicagem da garrafa de hemocultura para PVX, dado que a positividade pode ser devida a organismos mais fastidiosos.

De modo a reduzir o tempo de resposta de uma hemocultura positiva em que haja a indicação de sépsis ou caso se trate de uma criança, recorre-se ao sistema Accelarate Pheno[®], que identifica o microrganismo e realiza diretamente o TSA. (Cenci *et al.*, 2020)

- **Urina**

As infeções urinárias são das infeções bacterianas mais frequentes, sendo mais frequente ocorrer em mulheres, principalmente devido à estrutura anatómica do aparelho urinário, em que a uretra é mais curta e próxima da região perianal. (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007)

As amostras que mais frequentemente chegam ao laboratório são provenientes do jato médio da primeira urina da manhã (preferencialmente) e a colheita é feita pela própria pessoa, após a devida higienização da zona genital. As amostras podem ainda ser de saco coletor, cateter ou aspiração suprapúbica. A colheita é feita para um contentor estéril, sendo, posteriormente colocados 10 mL em tubo com ácido bórico, de forma a inibir a multiplicação bacteriana e reduzir a citólise.

O processamento da amostra inicia-se no equipamento UF-5000TM, que consiste na análise do sedimento, detetando e quantificando diversos elementos como leucócitos, eritrócitos, bactérias, células epiteliais. Este equipamento permite diferenciar as amostras que devem seguir para cultura das que não necessitam.

A inoculação para cultura das urinas é feita segundo uma técnica semi-quantitativa nos meios CLED e em GS, no equipamento DxM Autoplak. Os meios são incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. Após a incubação, é avaliado o crescimento microbiano semi-quantitativamente, como representado na Tabela 7.

Tabela 7. Avaliação semi-quantitativa das culturas de urina

Número de colónias	Interpretação	Procedimento
Sem crescimento	Negativo	
1-10 colónias (<10⁴ UFC/mL)	Interpretação consoante a história clínica	Identificação e TSA de acordo com a história clínica
10-100 colónias (10⁴-10⁵ UFC/mL)	Positivo/valorizar consoante a história clínica	Identificação e TSA de acordo com a história clínica
>100 colónias (>10⁵ UFC/mL)	Positivo	Identificação e TSA
>2 tipos de colónias	Flora mista	Rejeitar amostra, sugerir nova colheita

As amostras pediátricas, além de serem inoculadas nos meios acima descritos, são processadas no equipamento HB&L UROQUATTRO™, de modo a se verificar se a amostra é positiva ou negativa, em cerca de 4 horas. Neste equipamento as amostras são inoculadas em meio de Muller-Hinton e os frascos são incubados a 37°C. O sistema vai medir continuamente a dispersão da luz da amostra, monitorizado, assim, o crescimento bacteriano, através de curvas de crescimento em tempo real. (Pérez-Palacios *et al.*, 2020)

- **Fezes**

O trato gastrointestinal tem uma grande microbiota normal associada. Assim, para a coprocultura é necessário a escolha adequada do meio, de modo a inibir a microbiota normal, e para apenas crescer os microrganismos que possam estar a causar infeção. Após a colheita das fezes para um contentor estéril, o transporte para o laboratório deve ser o mais rápido possível de forma a evitar alterações resultantes do metabolismo bacteriano, que podem ser tóxicas para bactérias patogénicas, como *Shigella spp.* (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

Se não houverem outras indicações, o exame cultural é direcionado para a pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, sendo a inoculação feita no caldo de bacilos Gram negativo e nos meios SS e Hektoen. Após a incubação do caldo de bacilos Gram negativo ser incubado 18 horas é feita a repicagem para os meios SS e Hektoen, que são incubados a 37°C durante 24 a 48 horas.

Pode ainda ser pesquisado a presença de *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*, em que a amostra é inoculada nos meios CAM e CIN, respetivamente. O meio CAM é incubado a 42°C durante 48 horas em atmosfera microaerofílica, enquanto que o meio CIN é incubado a 37°C durante 18 a 24 horas em aerobiose. Se ao fim de 24 horas não se verificar qualquer crescimento, as placas voltam a ser novamente incubadas por mais 24 horas. (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007)

- **Líquido Cefalorraquidiano**

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é uma das proteções do cérebro e medula espinhal. Numa situação normal, é um líquido estéril. A análise do LCR é essencial no diagnóstico de infeções do SNC, uma vez que se há a presença de microrganismos no LCR significa que ultrapassaram a barreira hematoencefálica, causando encefalite, meningite ou meningoencefalite. A colheita é feita através de punção lombar por pessoal especializado, não devendo ser exposta ao calor ou frio. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

Devido à gravidade destas infeções que são consideradas emergências médicas, o transporte do LCR até ao laboratório deverá ser o mais célere possível. Assim que a amostra chega ao

laboratório, é feita uma primeira análise macroscópica de forma a analisar a cor e a turbidez. De seguida, este é centrifugado de forma a concentrar o sedimento, que vai ser inoculado por inunção nos meios BHI, GS e PVX e é feito um esfregaço para coloração de Gram. A incubação dos meios é feita a 37°C durante 24 a 72 horas.

- **Amostras Respiratórias**

As infeções respiratórias variam consoante a sua localização anatómica, podendo ser classificadas em infeções do trato respiratório superior ou inferior. O trato respiratório superior possui uma microbiota normal associada, por isso, deve avaliar-se o crescimento bacteriano de acordo com a história clínica e, principalmente, com a microbiota comensal. Pelo contrário, o trato respiratório inferior não possui microbiota. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016; Nester *et al.*, 2012)

As amostras respiratórias rececionadas no laboratório incluem: expetoração, aspirado brônquico e lavado broncoalveolar.

Na análise das expetorações, é importante uma interpretação cuidada, uma vez que na maioria das situações está contaminada com a microbiota do trato superior. Além disso, tem que se avaliar a qualidade da amostra. Para tal, quando a amostra é recebida no laboratório é feito um esfregaço para coloração de Gram, em que se vai avaliar a quantidade de células epiteliais, e leucócitos, além de se observar qual o microrganismo predominante. Assim, e de acordo com a Tabela 8, amostras com mais de 25 células epiteliais por campo são rejeitadas por estarem contaminadas com saliva. (Fonseca *et al.*, 2004)

Tabela 8. Classificação da observação microscópica das amostras respiratórias

Classificação	Células Epiteliais por campo	Leucócitos por campo
Raros	<10	<10
Alguns	10-25	10-25
Muitos	>25	>25

Por outro lado, os aspirados brônquicos e lavados bronco-alveolares são amostras obtidas por um procedimento invasivo. À semelhança das expetorações é feito um esfregaço para coloração de Gram para avaliar a qualidade da amostra, bem como qual o microrganismo predominante.

Estas amostras são inoculadas nos meios GS e HAE, e vão ser incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. (Fonseca *et al.*, 2004)

Em situações de pacientes com fibrose quística (FQ) ou doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), estas amostras, além de serem inoculadas nos meios referidos anteriormente, são

também cultivadas em BCSA e SGC2 para pesquisa de *Burkholderia cepacia* e fungos, respetivamente.

- **Exsudados purulentos**

Às amostras de exsudados purulentos podem ser estar associados diversos microrganismos. Assim, para a sua identificação, é necessário ter em conta a sua localização, bem como o modo de colheita. Algumas das amostras que chegam ao laboratório são pus de abcesso, exsudados de feridas e aspirados de feridas. Todas estas amostras são inoculadas em GS e CM, de forma se recuperar os microrganismos anaeróbios, e é feito um esfregaço para coloração de Gram. Contudo, nos exsudados de feridas a inoculação é feita apenas em GS uma vez que, normalmente, não está associada a infeção por anaeróbios. Os meios são incubados a 37°C durante 24 horas. (Fonseca *et al.*, 2004)

- **Exsudados vaginais e uretrais**

O trato genital possui uma flora comensal que em situações de défice imunológico do hospedeiro esta microbiota pode originar infeções, as denominadas infeções endógenas. Por outro lado, existem as infeções exógenas que são causadas por doenças sexualmente transmissíveis.

Estas amostras são colhidas por zaragatoa e colocadas em meio de transporte adequado de forma a manter a viabilidade dos microrganismos. Sendo que um dos microrganismos que pode estar presente é *Trichomonas vaginalis*, é realizado um exame a fresco que permite a sua deteção. As amostras são depois inoculadas em meio VCAT e CNA que permite o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae* e cocos de Gram positivo, respetivamente, além de serem, também, inoculadas em GS. A incubação é feita durante 18 a 24 horas a 37°C. Tal como nas restantes amostras, é feito um esfregaço para coloração de Gram, que permite a avaliação da presença de células epiteliais, leucócitos e qual a microbiota associada, possibilitando uma orientação para o diagnóstico. (Fonseca *et al.*, 2004; Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007)

Por último, pode-se ainda pesquisar *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* simultaneamente num kit comercial, com base nas suas características bioquímicas. Além disso, permite, também, a realização de TSA.

- **Outros líquidos**

As infeções bacterianas podem ainda afetar outros líquidos biológicos, como líquido sinovial, peritoneal e pleural. Amostras provenientes destes locais, em condições fisiológicas, são

estéreis. Assim, a sua colheita é feita por aspiração em condições assépticas. O líquido pleural encontra-se a revestir a cavidade torácica, enquanto que o líquido sinovial está nos espaços articulares. Estas amostras são inoculadas nos meios de GS, BHI e PVX e são incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. Por outro lado, o líquido peritoneal, devido à sua localização abdominal, é inoculado em GS e CM, de modo a verificar o crescimento de anaeróbios, sendo incubados a 37°C durante 24 a 48 horas, em condições de anaerobiose. Em qualquer uma destas amostras é também realizado um esfregaço para coloração de Gram. (Fonseca et al., 2004)

- **Cateter**

A utilização de cateteres pode levar à ocorrência de complicações, como infeções, relacionadas com a sua manutenção, daí a importância da sua análise, de modo a determinar se existe, ou não, colonização bacteriana. Assim, a inoculação do cateter é feita por rolamento em meio GS e BHI, incubados a 37°C durante 24 a 48 horas. (Fonseca et al., 2004)

Tabela 9. Amostras biológicas e respetivos patógenos que podem estar associados

Amostra	Microrganismos
Sangue	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus spp.</i> (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007)
Urina	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007)
Fezes	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007)
Produtos Respiratórios	<i>Haemophilus influenza</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007)
Exsudados vaginais e uretrais	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016)
LCR	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumonia</i> (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016)
Exsudados purulentos	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Fonseca et al., 2004)

7.2. Micobacteriologia

As micobactérias são bacilos imóveis, não formadoras de esporos e aeróbicas, com um crescimento lento. A parede celular destes bacilos é diferente das restantes bactérias, tendo uma composição rica em ácidos micólicos. Esta composição lipídica torna-as altamente hidrofóbicas, o que lhes confere resistência a ácidos e impede que sejam descoloradas na coloração de Gram, daí serem denominadas Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (BAAR).

O grupo mais frequentemente pesquisado é o das bactérias que provocam tuberculose no Homem que pertencem ao *Mycobacterium tuberculosis* complex, especialmente *Mycobacterium*

tuberculosis. A tuberculose é uma doença infecciosa que se transmite principalmente através de aerossóis respiratórios emitidos por pessoas contaminadas. As gotículas expelidas na tosse ou espirros, por exemplo, contêm estes bacilos, que se vão depositar nos pulmões, que são o local inicial da infeção. Assim, é essencial a nível de saúde pública o diagnóstico de pessoas infetadas e, para tal, os laboratórios que pesquisam micobactérias necessitam de um nível 2 ou 3 de biossegurança. (Levinson, 2014; Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016; Nester *et al.*, 2012)

7.2.1. Preparação das amostras

As amostras que chegam ao laboratório são maioritariamente do trato respiratório, como expectoração, lavado broncoalveolar ou aspirado brônquico. Todavia, também surgem amostra de sangue, urina, fezes, LCR, entre outros. Devido ao facto de a emissão de BAAR não ser diária, aconselha-se a colheita de amostra em 3 dias consecutivos.

Inicialmente as amostras sofrem um processo de descontaminação e concentração, para eliminação da microbiota associada à amostra, exceto o LCR que não necessita de descontaminação, dado que, à partida, é um líquido estéril. Para tal, as amostras são tratadas com uma solução com NaOH, N-acetil-L-cisteína (NALC) e citrato de sódio. O NaOH funciona como digestivo e descontaminante e o NALC é um agente mucolítico, o que permite que a amostra se torne mais fluida. O citrato de sódio impede que o NALC seja inativado ao ligar-se aos metais pesados que possam existir na amostra. Depois adiciona-se tampão fosfato que neutraliza a atividade do NALC-NaOH, impedindo a eliminação das micobactérias. As amostras são depois centrifugadas durante 15 minutos a 3000g, do qual se obtém o sedimento que é usado para inocular os meios de cultura. (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007)

No caso das fezes, como tem uma microbiota muito diversificada associada, antes da descontaminação faz-se uma suspensão em água destilada e, após agitação, a amostra é filtrada com uma gaze. Por outro lado, a urina é primeiramente centrifugada e só depois é feita a descontaminação. Ainda, as amostras de sangue em frascos de hemocultura são diretamente incubadas no sistema BACTEC™9120™.

7.2.2. Exame Microscópico

O exame microscópico da amostra é um método rápido de deteção de BAAR. A coloração usada nestes bacilos é a de Ziehl-Neelsen ou coloração de Kinyoun. Em ambas as técnicas as micobactérias são coradas com carbofucsina básica, sendo resistentes à descoloração pelo ácido-álcool. Posteriormente adiciona-se um corante de contraste, o azul de metileno. Assim, o que se observa microscopicamente é as micobactérias coradas de vermelho, enquanto que

o restante fundo está corado de azul. No entanto, na coloração de Ziehl-Neelsen quando é aplicada a carbofucsina é feito a quente, ao passo que na coloração de Kinyoun é feito a frio. Neste laboratório a técnica que se usa é a de Kinyoun. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

A observação microscópica após coloração pode ser feita a fresco, mas também em culturas positivas para confirmação da observação de estruturas características das micobactérias, como, por exemplo, a formação de cordas.

7.2.3. Cultura

Após o procedimento descrito anteriormente, as amostras são inoculadas nos meios Löwenstein-Jensen (LJ) e Mycobacteria Growth Incubator Tube (MGIT) para a detecção do crescimento de micobactérias.

O meio LJ é utilizado para o crescimento e diferenciação de micobactérias, dado que algumas espécies apresentam pigmentação, permitindo a sua identificação presuntiva. Este meio é constituído por verde malaquite e sais minerais que impedem o crescimento de microrganismos contaminantes, além de ter glicerol e ovo, que fornecem os ácidos gordos e proteínas necessárias para o metabolismo das micobactérias. A incubação do meio LJ é feita durante 6 semanas a 37°C, sendo verificado se existe crescimento diariamente.

O meio MGIT é um meio líquido enriquecido, constituído por um caldo Middlebrook 7H9 que é suplementado por uma mistura de antimicrobianos PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidixico, trimetoprim e azlocilina) que inibem o crescimento bacteriano e fúngico. Na base do tubo existe um sensor de oxigénio e, quando há crescimento bacteriano há consumo de oxigénio, pelo que o sensor vai emitir fluorescência. Este meio é incubado no aparelho BACTEC MGIT 960 a 37°C, que deteta a fluorescência das culturas positivas. (Pfyffer *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 1997)

No momento em que o equipamento alerta para uma cultura positiva é feito um esfregaço para corar pela técnica de Kinyoun para confirmar a existência de micobactérias e, também, é feita a inoculação em GS, para garantir que o crescimento não é de um outro microrganismo contaminante.

As hemoculturas, como já referido, são diretamente incubadas no sistema BACTEC™9120™, a 35°C. As garrafas de hemocultura para micobactérias têm um caldo Middlebrook 7H9 e na base existe um sensor que deteta a concentração de dióxido de carbono a cada 10 minutos, ou seja, há medida que há crescimento bacteriano vai aumentar a concentração de CO₂. Assim, a intensidade de fluorescência emitida é proporcional ao crescimento bacteriano.

7.2.4. Identificação

Quando as culturas são positivas para micobactérias, é necessário fazer a sua identificação. No CHUC, a identificação é feita através de testes de biologia molecular, nomeadamente a *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Aqui, vai haver a amplificação do DNA das micobactérias e as sequências são detetadas através da hibridização com sondas específicas complementares ao DNA das micobactérias.

Após a identificação da micobactéria, é necessário realizar o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Este é feito também no BACTEC MGIT 960, através da comparação do crescimento num tubo MGIT controlo (sem antibiótico), com outros 5 tubos com os principais antibióticos: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida.

7.3. Micologia

Os fungos são microrganismos eucariotas, que possuem uma parede celular rígida de quitina e uma membrana celular de ergosterol. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

Os fungos podem ser leveduras, fungos filamentosos ou dimórficos. As leveduras são microrganismos unicelulares, enquanto que os fungos filamentosos são multicelulares e constituídos por estruturas tubulares, denominadas hifas. Já os fungos dimórficos, que são clinicamente importantes, existem tanto na forma leveduriforme como filamentosa, dependendo das condições de temperatura: quando à temperatura ambiente existem na forma filamentosa, enquanto que à temperatura corporal existem na forma leveduriforme. (Levinson, 2014; Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016; Nester *et al.*, 2012)

Os fungos podem originar doença de três formas: desenvolvimento de uma reação alérgica ou asmática pelo indivíduo, crescimento do fungo no organismo (micose) ou produção de toxinas pelo fungo que são depois ingeridas. (Nester *et al.*, 2012)

As amostras para identificação laboratorial podem ser provenientes do trato respiratório, sangue, cabelo ou LCR, por exemplo. O diagnóstico laboratorial de infeções fúngicas baseia-se na observação microscópica e pela cultura do organismo. Quando a amostra chega ao laboratório vai ser inoculada no meio SGC2, que permite o crescimento de fungos, inibindo o crescimento bacteriano, devido aos antibióticos presentes. Estas culturas são incubadas em atmosfera aeróbica, com uma temperatura ótima para a maioria dos fungos entre 25°C e 30°C e seladas de forma a evitar a desidratação. A incubação é feita, normalmente, durante 2 semanas. Posteriormente, é feita a observação microscópica e macroscópica das colónias. Na análise macroscópica das colónias tem-se em consideração o aspeto e a cor, por exemplo, enquanto que na análise microscópica se observam estruturas como os esporos e hifas, por

exemplo. Para a observação microscópica, retira-se uma pequena porção da colônia, preferencialmente na periferia da cultura e coloca-se numa lâmina. Depois junta-se uma gota de azul de lactofenol e deposita-se a lamela para depois se proceder à observação microscópica. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

A identificação de um fungo isolado deve ser tida em conta com o contexto clínico do paciente, bem como da proveniência da amostra, dado que pode ser um contaminante.

7.4. Virologia

O laboratório de Virologia do CHUC encontra-se, no Hospital Pediátrico. Aqui, o diagnóstico de infeções virais é realizado através de métodos de biologia molecular pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real, uma técnica rápida e sensível.

A PCR em Tempo Real inicia-se com a amplificação da sequência de DNA em estudo. Caso a amostra seja positiva, durante a amplificação a amostra é hibridizada com sondas que vão emitir fluorescência, que será detetada por um fluorímetro que está associado ao termociclador. No caso de se procurarem vírus de RNA, antes da amplificação pela TaqPolimerase, a enzima Transcriptase Reversa converte a cadeia de RNA numa cadeia de DNA complementar. Quanto maior for a carga viral, menos ciclos de amplificação são necessários para se detetar a fluorescência. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

No HUC, a PCR em Tempo Real é utilizada nos sistemas GeneXpert® e VitaPCR™. É realizada ainda a PCR multiplex no sistema FilmArray® Torch. Esta metodologia permite detetar mais do que uma sequência alvo na mesma amostra.

7.5. Serologia

O princípio no qual a serologia se baseia é na especificidade da reação entre antigénio e anticorpo. Os anticorpos são imunoglobulinas em que a sua produção surge em resposta a um antigénio específico. (Levinson, 2014)

Assim, a serologia permite determinar o estado imunológico do paciente, se teve algum contacto com um agente infeccioso, ou se estamos perante uma situação aguda ou crónica. Além disso, em alguns casos, a serologia permite a monitorização terapêutica, bem como a avaliação da evolução da infeção, tendo por base a cinética dos anticorpos. Para tal, nesta área são necessárias sempre, pelo menos, duas amostras com intervalo de duas a três semanas, para se poder visualizar a cinética dos anticorpos, de modo a determinar o estado clínico.

O estudo mais frequente é o dos anticorpos das classes IgM e IgG. Quando há infeção por um agente patogénico, numa situação fisiológica, vai-se iniciar a resposta imunológica humoral,

que termina com a síntese de anticorpos. As IgMs são as primeiras imunoglobulinas a serem produzidas aquando de uma infeção, durante a resposta primária. Mais tardiamente surgem as IgG na resposta secundária. Deste modo, a presença de IgM positiva sugere uma infeção ativa ou recente, enquanto que as IgG positivas indicam infeção passada ou situação de imunidade. (Levinson, 2014)

No entanto, uma limitação da análise serológica é a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas.

7.5.1. Métodos Utilizados

- **Imunofluorescência Indireta**

No método de imunofluorescência indireta pesquisam-se anticorpos específicos do antígeno adsorvido na superfície sólida (neste caso, numa lâmina). Se na amostra estiver presente o anticorpo, este vai-se ligar, formando um complexo antígeno-anticorpo. De seguida, adiciona-se uma anti-globulina humana marcada com fluoresceína, que é visível ao microscópio de fluorescência. A intensidade de fluorescência vai ser diretamente proporcional à quantidade de anticorpos existentes na amostra. (Levinson, 2014; Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

- **Ensaio Imunoquimioluminescente**

O método CLIA é baseado na técnica de quimioluminescência. A amostra é incubada com partículas magnéticas revestidas por antígenos recombinantes específicos e, caso tenha anticorpos, estes vão-se ligar aos antígenos. Posteriormente adiciona-se uma antiglobulina humana marcada com isoluminol, que se vai ligar se o complexo anterior for formado. Por fim, adiciona-se um reagente que inicia a reação de quimioluminescência, em que o sinal luminoso vai ser medido e será proporcional à concentração de anticorpo na amostra. (Cinquanta, Fontana and Bizzaro, 2017; Wang *et al.*, 2012)

- **Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay**

A técnica de ELISA é um método imunoenimático que permite a deteção de anticorpos na amostra, uma vez que, numa superfície sólida se encontram adsorvidos os antígenos específicos do anticorpo que se pesquisa. Quando os anticorpos estão presentes na amostra, estes vão-se ligar aos antígenos, formando um complexo antígeno-anticorpo, que vai ser detetado ao se adicionar uma antiglobulina humana ligado a uma enzima. A revelação desta reação ocorre ao se adicionar o substrato enzimático cromogénico, que vai desenvolver cor

na presença da enzima. A quantidade de anticorpo na amostra vai ser, então, proporcional à intensidade de cor desenvolvida. (Levinson, 2014; Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

- **Enzyme Linked Fluorescence Assay**

É um teste imunoenzimático semelhante ao teste de ELISA. Se na amostra em estudo existirem os anticorpos específicos do antígeno adsorvido na superfície sólida, forma-se um complexo antígeno-anticorpo. De seguida, adiciona-se uma antiglobulina humana, marcada com fosfatase alcalina, que ao se adicionar o substrato origina uma reação que culmina com a formação de um produto fluorescente. A fluorescência é depois medida a 450 nm e a intensidade vai ser proporcional à quantidade de anticorpos presente na amostra. (Yolken and Stopa, 1979)

- **Treponema Passive Particle Agglutination**

O TP-PA é um teste treponémico de aglutinação em microplaca, com diluições sucessivas para a pesquisa de anticorpos de *Treponema pallidum*. À amostra adiciona-se uma suspensão de partículas de gelatina sensibilizadas com antígeno de *T. pallidum*. Caso a amostra seja positiva, ou seja, tenha anticorpos anti- *Treponema pallidum*, forma-se o complexo antígeno-anticorpo, que se observa macroscopicamente. (McPherson and Pincus, 2011)

- **Rapid Plasma Reagin**

O RPR é um teste não treponémico de aglutinação em placa, com diluições sucessivas para a deteção de reaginas. O antígeno de *Treponema pallidum* está ligado a partículas de cardiolipina, lecitina e colesterol com carvão ativado. Quando se adiciona a amostra, se estiverem presentes reaginas vai ocorrer aglutinação, que é visível macroscopicamente devido às partículas de carvão. Sempre que um teste RPR seja positivo, tem que ser confirmado por um teste treponémico. (McPherson and Pincus, 2011)

- **Rosa de Bengala**

Este método é um teste rápido utilizado para a deteção de anticorpos específicos (IgM e IgG) de *Brucella abortus*. (Ruiz-Mesa et al., 2005)

Consiste na aglutinação em placa entre a amostra do paciente e uma suspensão de *Brucella abortus* em solução tamponada inativada pelo calor e corada de Rosa de Bengala. Se a amostra for positiva observa-se macroscopicamente aglutinação na placa.

- **Reação de Wright**

A reação de Wright é realizada após um teste de Rosa de Bengala positivo. Este método de aglutinação em tubo permite quantificar os anticorpos presentes na amostra. Aqui, à amostra é adicionada uma suspensão padronizada de *Brucella abortus* inativada, fazendo-se diluições sucessivas de forma a determinar o título da amostra. Se se verificar uma reação com título igual ou superior a 1:80 a amostra é considerada positiva.

Tabela 10. Metodologias e Análises, alguns exemplos- setor de Serologia

Metodologia	Análise
Imunofluorescência Indireta (IFI)	Anticorpos anti- <i>Rickettsia conorii</i> IgG; anticorpos anti- <i>Coxiella burnetii</i> IgG.
Treponema Passive Particle Agglutination (TP-PA)	Anticorpos anti- <i>Treponema pallidum</i> .
Imunoquimioluminescência (CLIA)	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> IgG e IgM; anticorpos anti-Citomegalovírus IgG e IgM; anticorpos anti- <i>Rickettsia conorii</i> IgG e IgM.
Reação de Wright	Anticorpos anti- <i>Brucella abortus</i> -
Rosa de Bengala	Anticorpos anti- <i>Brucella abortus</i> .
ELISA	Anticorpos anti-adenovírus IgG e IgM; anticorpos anti- <i>Leptospira</i> IgG e IgM.
Enzyme Linked Fluorescence Assay (ELFA)	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> IgG e IgM; anticorpos anti-Citomegalovírus IgG e IgM; Testes de avidéz IgG <i>Toxoplasma gondii</i> .
Rapid Plasma Reagin (RPR)	Reaginas derivadas de infecção por <i>Treponema pallidum</i> .

7.6. Parasitologia

As infecções por parasitas estão distribuídas mundialmente. No entanto, a prevalência destas doenças é maior em zonas de clima temperado e tropical. Além dos habitantes destas áreas, com o aumento das viagens a países endêmicos de parasitas, o risco de infecção parasitária aumenta. Adicionalmente, o aumento de pacientes imunodeprimidos torna-os suscetíveis a estas doenças, principalmente por parasitas oportunistas. Assim, é de extrema relevância o conhecimento das doenças parasitárias, bem como dos organismos causadores e as suas características. (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

7.6.1. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial de doenças parasitárias é feito principalmente através da observação macroscópica e microscópica das amostras. No entanto, pode-se recorrer a métodos serológicos e/ou molecular no auxílio do diagnóstico.

A pesquisa dos parasitas pode ser realizada em diversos produtos biológicos, contudo, os mais frequentes são as fezes e o sangue.

- **FEZES**

Nas fezes, a pesquisa de parasitas intestinais consiste na procura de protozoários e helmintas, como amebas, flagelados ou nematodas. Nesta situação, devem ser colhidas pelo menos 3 amostras de fezes, em dias alternados. (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007)

Inicialmente, realiza-se a observação macroscópica de modo a identificar a consistência das fezes, se tem sangue, muco ou parasitas (ou fragmentos estruturais destes). Seguidamente, as amostras são processadas de acordo com as especificações do kit comercial ParasiTrap[®], que tem por base o método de Richie. Com este método obtém-se um sedimento derivado da concentração da amostra com formalina etileno acetato, que depois é observado ao microscópio para pesquisa de estruturas parasitárias, como ovos ou quistos, por exemplo.

São ainda realizados testes imunocromatográficos, que permitem a deteção qualitativa de antígenos parasitários na amostra, auxiliando no diagnóstico de uma infeção ativa.

Tabela II. Exemplos de parasitas intestinais encontrados nas fezes, após realização da técnica de concentração (Imagens adaptadas de CDC: Centers for Disease Control and Prevention)

Quisto de <i>Giardia lamblia</i>	Quisto de <i>Entamoeba histolytica</i>	Ooquisto de <i>Cryptosporidium parvum</i> (corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada)
		

- **SANGUE**

As amostras de sangue devem ser colhidas tendo em consideração o ciclo de vida do parasita suspeito, uma vez que pode não se encontrar na corrente sanguínea em certas horas do dia. Para observação microscópica realiza-se esfregaço sanguíneo fino e/ou gota espessa, que são posteriormente corados pela coloração de Giemsa. Esta coloração contém eosina que é carregada negativamente, logo vai corar as estruturas básicas das células de vermelho, e azul de metileno vai corar as estruturas celulares ácidas de um tom de azul/roxo. À semelhança do que acontece com as amostras de fezes, no sangue também se pode realizar testes imunocromatográficos, como a deteção de antigénio de *Plasmodium spp.*, que indica uma infeção ativa. (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016)

Nas Tabelas 12 e 13 alguns exemplos de parasitas que se podem observar no sangue.

Tabela 12. Exemplos de parasitas no sangue, observados em esfregaços sanguíneos finos após coloração por Giemsa (Imagens adaptadas de CDC: Centers for Disease Control and Prevention)

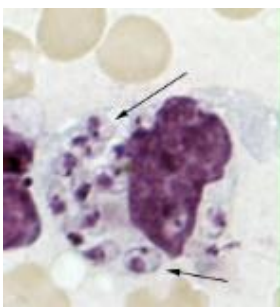
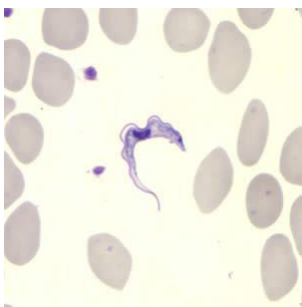
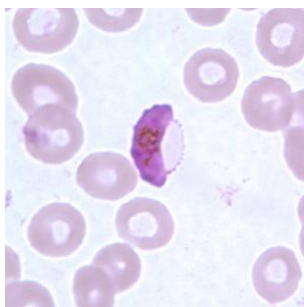



<i>Leishmania spp.</i> Formas amastigotas	<i>Trypanossoma spp.</i> Forma tripomastigota	Gametócitos de <i>Plasmodium falciparum</i>
		

Tabela 13. Exemplos de parasitas no sangue, observados em gota espessa após coloração por Giemsa (Imagens obtidas no CHUC)

Microfilária de <i>Wuchereria bancrofti</i>	Microfilária de <i>Brugia malayi</i>	Microfilária de <i>Loa loa</i>
		

8. CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO I

Doente do sexo feminino, com 81 anos dirigiu-se ao Serviço de Urgência do CHUC após uma queda, seguida de tonturas, cansaço fácil e febre.

A utente nega vómitos, alteração da visão, arrepios ou febre anterior. Refere cefaleia, mas não caracteriza.

Ao exame físico não apresenta alterações, nem se verificam alterações neurológicas. Teve infeção por SARS-CoV2 há cerca de 1 mês.

Devido à queda, foi realizada uma tomografia computadorizada, onde não se observaram lesões endocranianas de natureza traumática aguda.

Assim, para orientar o diagnóstico foram realizadas análises, cujos resultados se encontram no Anexo I (Tabela 14 e Tabela 15).

Verifica-se um aumento dos valores de azoto ureico e creatinina, o que sugere um possível início de lesão renal, além do aumento de LDH, AST, CK e Troponina I que indicam que está a ocorrer um dano celular, possivelmente a nível cardíaco. Observa-se também o aumento da Proteína C Reativa e procalcitonina, que são proteínas de fase aguda, revelando a existência de uma inflamação/infeção. A nível hematológico, apresenta uma anemia normocítica normocrómica, que normalmente se encontra associada a doenças crónicas, e trombocitopenia. Por outro lado, o aumento do tempo de protrombina não será de causa hepática devido aos valores de albumina se encontrarem normais, além de estar associado ao aumento do fibrinogénio e D-dímeros. Apresenta ainda uma diminuição nos valores de cálcio.

Para monitorização da situação clínica da doente, foram sendo repetidas as análises bioquímicas, em que se revelou um agravamento do quadro clínico. Adicionalmente foi determinada a concentração de Vitamina D, sendo o resultado obtido sugestivo de uma situação de deficiência. Isto justifica o valor reduzido de cálcio, uma vez que esta vitamina induz a absorção intestinal de cálcio, logo se não há vitamina D, a absorção de cálcio não ocorre.

Como a doente apresentava febre, esta poderia ser de causa bacteriana, pelo que se fez colheita de amostra para hemocultura e urocultura.

A análise da urina não revelou a presença de leucocitúria ou bacteriúria significativa para a realização do exame cultural. Apenas é de salientar a presença de hemoglobina e proteínas na urina, sugestivo de alteração renal.

Por outro lado, a hemocultura foi positiva. Como tal, a amostra foi inoculada em GS e realizou-se um esfregaço para coloração de Gram, onde se observaram bacilos Gram negativo.

De modo a fornecer uma possível identificação mais rapidamente, realizou-se a pesquisa dos principais agentes associados a bacteriemia, num painel multiplex de hemoculturas no Accelarate Pheno[®], onde não se detetou nenhum dos microrganismos pesquisados, como apresentado no Anexo I (Tabela I6).

Após a incubação da GS, observou-se o crescimento de colónias pequenas sem hemólise, como observado na Figura 1.

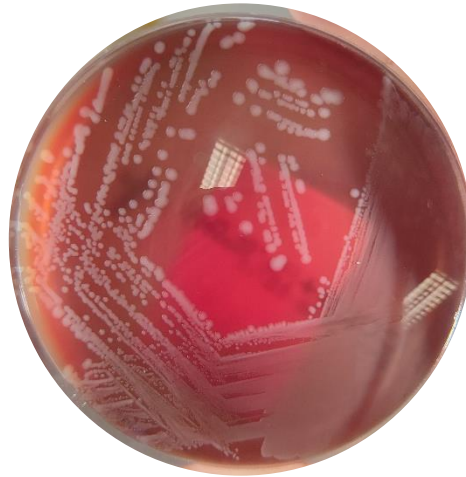


Figura 1. Crescimento bacteriano na gelose de sangue

Posteriormente realizou-se a identificação bacteriana, cujo resultado foi *Pasteurella multocida*. De seguida, realizou-se o antibiograma manual em meio MH-F, de acordo com as regras recomendadas pelo EUCAST. O resultado de TSA obtido encontra-se na Figura 2.

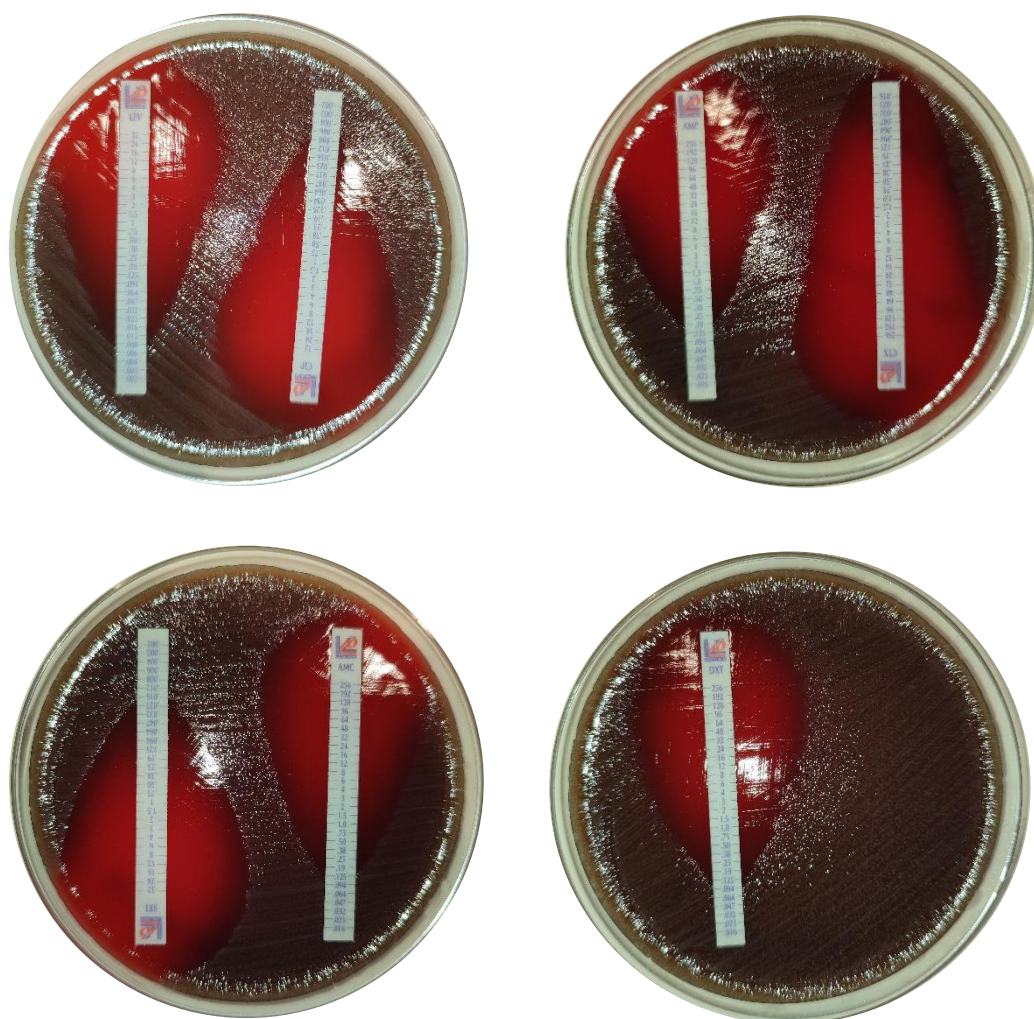


Figura 2. Antibiograma manual para *Pasteurella multocida*: tiras E-test

Assim, concluiu-se que a bactéria *Pasteurella multocida* era suscetível aos antibióticos testados: doxiciclina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefotaxima, levofloxacina, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazole. Após o início da terapêutica, verificou-se o princípio da melhoria do quadro clínico.

Primeiramente, foi iniciada uma terapêutica empírica com ceftriaxone e meropenemo e, após os resultados do TSA, foi instaurada uma terapêutica direcionada ao tratamento da infecção por *Pasteurella multocida*, de acordo com as suas suscetibilidades.

A *Pasteurella multocida* é uma infecção zoonótica e, como tal, na admissão da doente, teria sido relevante perguntar se tinha alguma mordida/arranhão de animais ou se tinha animais domésticos, o que ajudaria na orientação do processo de diagnóstico. Uma das complicações da infecção por *Pasteurella multocida* é a nível cardíaco. De acordo com os valores de troponina I, fibrinogénio e D-dímeros elevados, pode, então, estar a ocorrer uma lesão cardíaca de origem bacteriana.

CASO CLÍNICO 2

Doente do sexo masculino, 76 anos seguido na consulta de urologia desde 2010 após transplante renal. A 15/3 dirigiu-se ao estabelecimento médico para monitorização. Encontrase a fazer terapia imunossupressora.

Ao exame objetivo não apresenta alterações. Para controlo foram feitas análises de rotina, com alteração nos parâmetros descritos no Anexo 2 (Tabela 17).

Os valores obtidos de creatinina e de azoto ureico elevados explicam-se pelo facto deste doente ser um transplantado renal, em que a insuficiência persiste, pelo que a eliminação destes metabolitos está deficitária, logo vão acumular na corrente sanguínea. O que mais se destaca é o aumento dos marcadores hepáticos, que até à altura se encontravam normais.

Perante estes resultados, o doente foi reencaminhado para a consulta de Medicina Interna, com a requisição de análises com parâmetros da função hepática e ecografia abdominal.

Na ecografia abdominal não foram observadas alterações significativas. O paciente nega hábitos alcoólicos e não tem antecedentes de patologia hepática, nem apresenta sintomatologia.

Entre as duas consultas o paciente realizou as análises requeridas com os testes da função hepática, e no dia da consulta repetiu a bioquímica, cujos resultados se apresentam no Anexo 2 (Tabela 18 e Tabela 19).

Com esta repetição, verifica-se que o azoto ureico, creatinina e as enzimas hepáticas continuam elevadas. Além disso, tem um aumento do número de eritrócitos, microcitose (Volume Corpuscular Médio diminuído), hipocromia (Hemoglobina Globular Média diminuída) e anisocitose (RDW aumentado).

Como as enzimas permaneciam elevadas, tentou-se encontrar a causa desta alteração hepática, pelo que foram determinados diversos parâmetros que poderiam estar na sua origem.

Uma das causas é a hepatite autoimune. Como tal, pesquisou-se a presença de auto anticorpos, cujos resultados obtidos se apresentam no Anexo 2 (Tabela 20). Sendo os resultados obtidos negativos, pode-se excluir uma situação de hepatite autoimune.

Deste modo, prosseguiu-se o estudo, uma vez que a hepatite pode ainda ter origem viral, bacteriológica ou tóxica. Tendo isto em conta, realizou-se a análise serológica, com os resultados descritos no Anexo 2 (Tabela 21). Deste painel de resultados, averigua-se que o paciente teve uma infeção prévia por Epstein-Barr, *Parvovirus* e *Mycoplasma spp.*. Encontra-se ainda imune contra o Vírus da Hepatite B (HBV) e Vírus da Hepatite A (HAV). No entanto, o destaque aqui é para o facto de ter IgG e IgM anti-HEV (vírus Hepatite E) positivas, o que

significa uma provável infecção recente. Posto isto, fez-se a carga viral de HEV para a sua quantificação, cujo resultado obtido foi de detetado, com uma quantificação de 2650000 cópias/mL.

Deste modo, por exclusão das causas possíveis, o diagnóstico do paciente é hepatite por vírus da Hepatite E, que se verifica com a carga viral elevada. Posteriormente, o tratamento foi feito com ribavirina, um fármaco antiviral, inibindo a replicação do vírus da Hepatite E.

9. CONCLUSÃO

Estagiar num hospital central como o CHUC permitiu-me integrar uma equipa multidisciplinar, que se revelou uma mais valia para o meu crescimento, tanto pessoal, como profissional, dando-me a conhecer a rotina de um laboratório de análises clínicas. Acima de tudo, possibilitou a consolidação de conhecimentos adquiridos no mestrado, aplicando-os na prática laboratorial.

Esta experiência levou a que me apercebesse do quão é importante uma formação de qualidade dos profissionais de saúde, tendo em conta as implicações que acarreta no diagnóstico fidedigno.

Foi um privilégio ter a oportunidade de estagiar no CHUC e de contactar com uma equipa que se foca na melhoria contínua, de modo a obter um desempenho cada vez melhor e adequado às necessidades dos pacientes.

10. REFERÊNCIAS

AYDIN, Suleyman *et al.* - **Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives.** *Vascular Health and Risk Management.* Vol 15 (2019), 1–10.

BURTIS, Carl A.; BRUNS, David E. - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** 7ª Ed. Saunders, Elsevier (2015).

CENCI, Elio *et al.* - **Accelerate Pheno™ blood culture detection system: a literature review.** *Future Microbiology.* Vol 15, nº16 (2020), 1595–1605.

CHRISTOV, Marta; JÜPPNER, Harald - **Phosphate homeostasis disorders.** *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* Vol. 32, nº5 (2018), 685–706.

CINQUANTA, Luigi; FONTANA, Desré Ethel; BIZZARO, Nicola - **Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?** *Autoimmunity Highlights.* Vol. 8, nº1 (2017), 9.

DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE. **Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus.** Norma da Direção Geral da Saúde. (2011), 1–13.

FEVERY, Johan - **Bilirubin in clinical practice: a review.** *Liver International.* Vol. 28, nº5 (2008), 592–605.

FONSECA, Ana Bruschy *et al.* - **ORIENTAÇÕES PARA A ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BACTERIOLOGIA.** Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI), Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA). (2004) 1–193.

FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 12ª Ed. Missouri : Mosby, Elsevier Inc, (2007).

GAGGIN, Hanna K.; JANUZZI, James L. - **Biomarkers and diagnostics in heart failure.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* Vol. 1832, nº12 (2013) 2442–2450.

GAW, Allan *et al.* - **Clinical Biochemistry An Illustrated Colour Text.** Elsevier Ed.

GIANNINI, E. G. - **Liver enzyme alteration: a guide for clinicians.** *Canadian Medical Association Journal.* Vol. 172, nº3 (2005) 367–379.

GUERRA RUIZ, Armando Raúl *et al.* - **Measurement and clinical usefulness of bilirubin in liver disease.** *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio.* Vol. 2, nº3 (2021) 352–361.

HALL, Christian - **Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP**. European Journal of Heart Failure. Vol. 6, n°3 (2004) 257–260.

HUIDOBRO E., Juan Pablo; TAGLE, Rodrigo; GUZMÁN, Ana María - **Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular**. Revista médica de Chile. Vol. 146, n°3 (2018) 344–350.

JAGDISH, Rakesh Kumar; MARAS, Jaswinder Singh; SARIN, Shiv Kumar - **Albumin in Advanced Liver Diseases: The Good and Bad of a Drug!** Hepatology. Vol 74, n°5 (2021) 2848–2862.

JORGENSEN, James H.; PFALLER, Michael A – **Manual of Clinical Microbiology**. 11^a Ed. ASM Press, (2015).

JORGENSEN, James H.; FERRARO, Mary Jane - **Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices**. Clinical Infectious Diseases. Vol.49, n°11 (2009) 1749–1755.

LEE, Tae Hoon; KIM, W. Ray; POTERUCHA, John J. - **Evaluation of Elevated Liver Enzymes**. Clinics in Liver Disease. Vol. 16, n°2 (2012) 183–198.

LEVINSON, Warren - **Review of Medical Microbiology and Immunology**. 13^a Ed, McGraw-Hill Education, (2014).

LIEBERMAN, Michael; PEET, Alisa - **Marks' Basic Medical Biochemistry, a Clinical Approach**. Philadelphia: Wolters Kluwer, (2018).

MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. - **HENRY'S CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT By Laboratory Methods**. 22^a Ed, Philadelphia: Saunders, Elsevier Inc., (2011).

MEDICINE, European Confederation Of Laboratory - European urinalysis guidelines. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum**. Vol. 231 (2000) 1–86.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **MEDICAL MICROBIOLOGY**. 8^a Ed, Philadelphia: Elsevier Inc, (2016).

NESTER, Eugene W. *et al.* - **Microbiology A Human Perspective**. 7^a Ed. New York: McGraw-Hill, (2012).

NOMURA, Naohiro; SHODA, Wakana; UCHIDA, Shinichi - **Clinical importance of potassium intake and molecular mechanism of potassium regulation.** Clinical and Experimental Nephrology. Vol. 23, n°10 (2019) 1175–1180.

PATEL, Robin - **MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases.** Clinical Chemistry. Vol. 61, n°1 (2015) 100–111.

PÉREZ-PALACIOS, Patricia *et al.* - **Assessment of a semi-automated enrichment system (Uroquattro HB&L) for detection of faecal carriers of ESBL-/AmpC-producing Enterobacteriales.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 38, n°8 (2020) 367–370.

PFYFFER, G. E. *et al.* - **Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli.** Journal of Clinical Microbiology. Vol 35, n°2 (1997) 364–368.

RIVERA, A. B. *et al.* - **Rapid and improved recovery rate of Mycobacterium tuberculosis in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Löwenstein Jensen medium.** The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Vol.1, n°5 (1997) 454–9.

RUIZ-MESA, J. D. *et al.* - **Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas.** Clinical Microbiology and Infection. Vol.11, n°3 (2005) 221–225.

SÁNCHEZ, Gema María Varo; GODINO, Ana Sáez-Benito - **Manual de Urgencias del Laboratorio Clínico 2013,** Asociación Española de Biopatología Médica, (2013).

SEITZ, J. M. *et al.* - **Magnesium degradation products: Effects on tissue and human metabolism.** Journal of Biomedical Materials Research Part A. Vol 102, n°10 (2014) 3744–3753.

STRAZZULLO, Pasquale; LECLERCQ, Catherine - **Sodium.** Advances in Nutrition. Vol.5, n°2 (2014) 188–190.

VANPUTTE, Cinnamon L.; REGAN, Jennifer L.; RUSSO, Andrew F. - **Seeley's anatomy & physiology.** 12^a Ed. Nova Iorque : McGraw-Hill Education, (2019).

WANG, Chen *et al.* - **Chemiluminescent Immunoassay and its Applications.** Chinese Journal of Analytical Chemistry. Vol.40, n°1 (2012) 3–10.

YOLKEN, R. H.; STOPA, P. J. - **Enzyme-linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus.** Journal of Clinical Microbiology. Vol.10, n°3 (1979) 317–321.

ANEXOS

ANEXO I- Caso Clínico I

Tabela 14. Resultados alterados nas análises de admissão hospitalar- bioquímica

	Resultado	Valores de Referência
Creatinina	1,33 mg/dL	0,55-1,02 mg/dL
Azoto Ureico	29,3 mg/dL	7,9-20,9 mg/dL
Cálcio	8,6 mg/dL	8,8-10,6 mg/dL
LDH	291 U/L	<247 U/L
AST	45 U/L	<31 U/L
GGT	58 U/L	<38 U/L
CK	937 U/L	<145 U/L
Troponina I- alta sensibilidade	309,2 ng/L	<16 ng/L
PCR	22,63 mg/dL	<0,50 mg/ dL
Procalcitonina	14,5 ng/mL	0-0,5 ng/ mL

Tabela 15. Resultados das análises de admissão hospitalar- hematologia

	Resultado	Valores de Referência
Eritrócitos	$3,96 \times 10^{12}/L$	$3,85-5,2 \times 10^{12}/L$
Hemoglobina	11,3 g/dL	11,8-15,8 g/dL
Hematócrito	32,9%	35-45,5%
Volume Corpuscular Medio	83,1 fL	80-101 fL
Hemoglobina Corpuscular Media	28,5 pg	27-34 pg
C. Hemoglobina Corpuscular Media	34,3 g/dL	31-37 g/dL
Coeficiente Variação Eritrócitos	13,1	11,5-15,0
Plaquetas	$84 \times 10^9/L$	$140-385 \times 10^9/L$
Tempo de Protrombina	23,1 seg	9,4-12,5 seg
Fibrinogénio	567,0 mg/dL	200-500 mg/dL
D-Dímeros	5417 ng/mL	<500 ng/mL

Tabela 16. Resultados obtidos no painel multiplex de hemoculturas do Accelarate Pheno®

Painel Multiplex Hemoculturas	Resultado
<i>Enterococcus faecalis</i>	Não detetado
<i>Enterococcus faecium</i>	Não detetado
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não detetado
<i>Staphylococcus spp.</i>	Não detetado
<i>Staphylococcus aureus</i>	Não detetado
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não detetado
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Não detetado
<i>Streptococcus spp.</i>	Não detetado
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grupo B)	Não detetado
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não detetado
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grupo A)	Não detetado
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex	Não detetado
<i>Bacteroides fragilis</i>	Não detetado
<i>Enterobacterales</i>	Não detetado
<i>Enterobacter cloecae</i> complex	Não detetado
<i>Escherichia coli</i>	Não detetado
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Não detetado
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Não detetado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> group	Não detetado
<i>Proteus spp.</i>	Não detetado
<i>Salmonella spp.</i>	Não detetado
<i>Serratia marcescens</i>	Não detetado
<i>Haemophilus influenzae</i>	Não detetado
<i>Neisseria meningitidis</i>	Não detetado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Não detetado
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Não detetado
<i>Candida albicans</i>	Não detetado
<i>Candida auris</i>	Não detetado
<i>Candida glabrata</i>	Não detetado
<i>Candida Krusei</i>	Não detetado
<i>Candida parapsilosis</i>	Não detetado
<i>Candida tropicalis</i>	Não detetado
<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	Não detetado
CTX-M	Não aplicável
IMP	Não aplicável
KPC	Não aplicável
mcr-I	Não aplicável
mecA/C	Não aplicável
mecA/C and MREJ (MRSA)	Não aplicável
NDM	Não aplicável
OXA-48-like	Não aplicável
vanA/B	Não aplicável
VIM	Não aplicável

ANEXO 2- Caso Clínico 2

Tabela 17. Resultados alterados nas análises de rotina

	Resultado	Valores de Referência
Creatinina	1,42 mg/dL	0,72-1,18 mg/dL
Azoto Ureico	32,6 mg/dL	7,9-20,9 mg/dL
AST	140 U/L	<35 U/L
ALT	241 U/L	<45 U/L
FA	143 U/L	30-120 U/L
GGT	127 U/L	<55 U/L

Tabela 18. Resultados das repetições analíticas

	Resultados	Valores de Referência	19/4/2022	15/3/2022
Azoto Ureico	32,6	7,9-20,9 mg/dL	35	30
Creatinina	1,32	0,72-1,18 mg/dL	1,21	1,42
AST	103	<35 U/L	168	140
ALT	191	<45 U/L	321	241
Fosfatase Alcalina	131	30-120 U/L	154	143
Gama GT	157	<55 U/L	174	127

Tabela 19. Resultados de hemograma simples

	Resultados	Valores de Referência	19/4/2022
Leucócitos	9,3	3,60-10,5 ×10 ⁹ /L	7,8
Eritrocitos	6,51	4,00-5,65 ×10 ¹² /L	7,03
Hemoglobina	13,1	11,8-15,8 g/dL	13,6
Hematocrito	40,7	37-49 %	43,1
Volume Corpuscular Medio	62,5	80-101 fL	61,3
Hemoglobina Corpuscular Média	20,1	27-34 pg	19,3
C.Hemoglobina Corpuscular Media	32,2	31-37 g/dL	31,6
Coeficiente Variação Eritrócitos	19,9	11,5-15,0	19,9
Plaquetas	210	140-385	232
Volume Plaquetar Medio	10,2	8,5-12,0	
Plaquetocrito	0,22	0,20-0,45	
Coeficiente Variação Plaquetas	15,2	9,0-17,0	

Tabela 20. Resultados de pesquisa de autoanticorpos

	Anticorpos	Resultado	
Doenças Autoimunes Sistêmicas	Ac anti-nucleares e citoplasmáticos	Núcleo	Negativo
		Nucléolos	Negativo
		Metáfase	Negativo
		Citoplasma	Negativo
		Anti-SSA60, SSB, Sm, RNP, Scl70, JOI	Negativo
	Anti-Mitocondriais	Negativo	
Doenças Hepáticas	Anti-Piruvato DH (IgG, IgA, IgM)- M2	Negativo	
Autoimunes	Anti-Músculo Liso	Negativo	
	Anti-LKM	Negativo	
	Anti-Antigénio Solúvel Hepático (SLA)	Negativo	

Tabela 21. Resultados da análise serológica

Agente Infecioso	Resultado	Interpretação
Epstein-Barr	VCA →IgG + →IgM -	Sugestivo de infecção prévia
<i>Treponema pallidum</i>	Negativo	Sem anticorpos específicos
<i>Brucella</i>	Negativo	Sem anticorpos específicos
Parvovírus	IgG + IgM -	Sugestivo de infecção prévia
<i>Rickettsia</i>	IgG -	Sem anticorpos específicos
<i>Coxiella</i>	IgG -	Sem anticorpos específicos
<i>Borrelia</i>	IgG - IgM -	Sem anticorpos específicos
<i>Legionella pneumophila</i>	Negativo	Infeção não provável
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	IgG + IgM -	Sugestivo de infecção prévia
HIV	Não reativo	Ausência de antígenos e anticorpos específicos
Interferon Gama	Negativo	Infeção por <i>M. tuberculosis</i> não provável
Hepatite A	IgG reativo IgM não reativo	Imune (infecção anterior ou vacinação)
Hepatite B	HBsAg não reativo HBsAc reativo HBcAc (total) não reativo	Imune
Hepatite C	Anti-HCV IgG/IgM não reativo	Sem anticorpos específicos
Hepatite E	IgG + IgM +	Sugestivo de infecção recente