

Maria Teresa Abrunhosa Ferraz Alves

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Lurdes Fernandes, Dra. Ana Paula Castro e pela Professora Doutora Olga Maria Cardoso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Teresa Abrunhosa Ferraz Alves

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Lurdes Fernandes, Dra. Ana Paula Castro e pela Professora Doutora Olga Maria Cardoso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Índice

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Introdução	1
Caracterização dos Laboratórios de Estágio	3
Fase pré-analítica	4
Fase analítica	4
Fase pós-analítica	5
Controlo de qualidade	5
Atividades desenvolvidas	7
I. Bioquímica	9
I.1 Equipamentos e métodos utilizados	9
I.2 Metabolismo proteico	11
Proteínas totais	11
Proteínas urinárias	11
Albumina	12
Proteína C Reativa (PCR)	12
Imunoglobulinas	13
Eletroforese de proteínas no soro	14
I.3 Metabolismo Glicídico	16
Glucose	16
I.4 Metabolismo Lipídico	18
Colesterol	18
Triglicéridos	19
Colesterol HDL	19
Colesterol LDL	20
Avaliação do perfil lipídico	20
I.5 Função renal	22
Ureia	22
Creatinina	23
Clearance da creatinina	23

Ácido úrico	24
Microalbuminúria	25
Análise sumária de urina	25
1.6 Função hepática	27
Aspartato aminotransferase (AST)	27
Alanina aminotransferase (ALT)	28
Gama-glutamil transferase (γGT)	29
Fosfatase alcalina (ALP)	29
Bilirrubina total	29
Bilirrubina conjugada	30
1.7 Função pancreática	31
Amilase	31
Lipase	31
1.8 Metabolismo do ferro	32
Ferro sérico	32
Ferritina	33
Transferrina	33
1.9 Avaliação cardíaca	34
Creatina cinase (CK)	34
Lactato desidrogenase (LDH)	34
1.10 Metabolismo mineral e ósseo	35
Cálcio total	35
Fosfato	36
Magnésio	36
1.11 Eletrólitos	37
Sódio	37
Potássio	38
Cloreto	38
2. Microbiologia	39
2.1 Equipamentos e métodos utilizados	39
2.2 Colheita, transporte e conservação das amostras	40
2.3 Testes de identificação microbiológica	41
2.4 Testes de sensibilidade a antimicrobianos	43
2.5 Meios de cultura	45

2.6 Urina	48
2.7 Sangue	49
2.8 Exsudado vaginal	50
2.9 LCR	51
2.10 Cateter	52
2.11 Zaragatoa	52
2.12 Fezes	53
2.13 Líquido	54
2.14 Pus	54
2.15 Expetoração e outras amostras respiratórias	55
2.16 Esperma	57
2.17 Casos clínicos	57
Conclusão	61
Bibliografia	63

Índice de Figuras

Figura 1: Traçado eletroforético normal numa eletroforese capilar	14
---	----

Índice de tabelas

Tabela 1: Equipamentos existentes no LAC Dr. Ferraz Alves	7
Tabela 2: Padrões eletroforéticos típicos de algumas situações patológicas	15
Tabela 3: Classificação de hiperlipoproteinémias	21
Tabela 4: Classificação de hipolipoproteinémias	21
Tabela 5: Antibióticos mais comuns nos diferentes produtos biológicos	44
Tabela 6: Meios de cultura utilizados no CHTMAD	45

Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato

AEQ – Avaliação externa da qualidade

ALT – Alanina aminotransferase

ALP – Fosfatase alcalina

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

AVC – Acidente vascular cerebral

BAAR – Bacilos ácido-álcool resistentes

BK – Bacilo de Koch

BLEA – β -lactamases espectro alargado

CHTMAD – Centro Hospitalar de Trás-os-Montes de Alto Douro

CLED – Cystine Lactose Electrolyte Deficient

CMI – Concentração mínima inibitória

CQI – Controlo de qualidade Interno

DCV – Doenças cardiovasculares

DGS – Direção Geral da Saúde

CK – Creatina cinase

DT – Diretor Técnico

HbA1c – Hemoglobina glicada A1C

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ISE – Eléctrodo seletivo de iões

LAC – Laboratório de Análises Clínicas

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LDH – Lactato desidrogenase

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

NAD⁺ – Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

NADP – Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato

NADPH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido

PCR – Proteína C Reativa

PTOG – Prova da Tolerância Oral à Glicose

QM – Quilomicron

SIADH – Síndrome inadequado da hormona anti-diurética

TFG – Taxa de filtração glomerular

TSA – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

UFC – Unidades formadoras de colónias

UV – Ultravioleta

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade

γ GT – Gama-glutamyl transferase

Resumo

As análises clínicas tornaram-se importantes meios complementares de diagnóstico colocados à disposição dos profissionais de saúde e dos utentes, através da deteção e/ou medição de dadas substâncias em amostras de produtos biológicos.

O presente relatório de estágio tem como principal objetivo descrever as práticas executadas diariamente num laboratório de análises clínicas. De forma a diversificar o estágio, a primeira parte foi efetuada num laboratório privado, com incidência nas áreas da Bioquímica e Hematologia, e a segunda parte numa Unidade Hospitalar, nas áreas da Microbiologia e Imunologia. Abordando todas as valências durante os 6 meses de estágio, foi proporcionada a aquisição de várias habilidades práticas e a oportunidade de aplicar na prática os conhecimentos obtidos na formação teórica.

Será feita uma introdução aos laboratórios em causa e abordada a fase pré-analítica, analítica e pós-analítica, tendo sempre em conta as regras da qualidade, de forma a reduzir o número de erros e a aumentar a confiança dos resultados. As valências aprofundadas neste relatório serão a Bioquímica e a Microbiologia, descrevendo os equipamentos existentes e respetivos fundamentos, metodologias utilizadas e enquadramento teórico.

Abstract

Clinical analysis have become important complementary means of diagnosis available to health professionals and users, through the detection and measurement of substances in organic produce samples.

This internship report aims to describe the practices performed daily in a clinical laboratory. In order to diversify, the first part was done in a private laboratory, focusing on Biochemistry and Haematology, and the second part in a public hospital, in the areas of Microbiology and Immunology. During 6 months, it was provided to acquire various practical skills and the opportunity to apply in practice the knowledge acquired in theoretical classes.

It will be done an introduction to the laboratories, approaching the pre-analytical phase, analytical and post-analytical, taking into account the quality rules in order to reduce the number of errors and increase the confidence in the results. In this report the valences in-depth will be Biochemistry and Microbiology, describing the equipment, methodologies and theroretical framework.

Introdução

O Mestrado em análises clínicas é composto por 2 anos de estudo, durante os quais se obtém o conhecimento e formação académica que, no final, é necessário colocar em prática. Desta feita é efetuado um estágio curricular num laboratório, durante o qual é dada a oportunidade de transpor a teoria para a prática profissional. Além disso, permite também a perceção das diversas responsabilidades de um técnico superior de análises clínicas, que atua na prevenção, controlo e diagnóstico de variadas patologias.

O estágio foi realizado em dois locais distintos. De 1 de dezembro a 29 de fevereiro num laboratório privado, Laboratório de Análises Clínicas (LAC) Dr. Ferraz Alves Lda., Vila Real, e de 1 de março a 31 de maio no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro – Unidade Hospitalar de Vila Real (CHTMAD). Durante o estágio foi possível contactar com as diferentes áreas das análises clínicas.

Com este relatório pretende-se descrever o fundamento e procedimento das técnicas e métodos utilizados num laboratório, desde a fase pré-analítica até à entrega de resultados, tendo em conta os procedimentos de controlo de qualidade.

Caracterização dos Laboratórios de Estágio

O estágio decorreu entre dois laboratórios, o Laboratório de Análises Clínicas Dr. Ferraz Alves Lda. e o serviço de Patologia Clínica do CHTMAD – Unidade Hospitalar de Vila Real.

O LAC Dr. Ferraz Alves cuja direção técnica cabe ao Dr. Augusto Ferraz Alves, especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, está sediado no centro da cidade de Vila Real e possui uma rede de postos de colheitas no mesmo distrito. Nos postos, as colheitas são efetuadas por técnicos competentes e habilitados que depois são responsáveis por levar as amostras à sede em tempo útil e cumprindo os requisitos de qualidade. Assim, a sede do laboratório e os postos de colheitas funcionam como um todo, sendo sempre necessária a cooperação entre os técnicos e os técnicos superiores.

O serviço de Patologia Clínica do CHTMAD, Vila Real, encontra-se sob orientação do Diretor de Serviço Dr. José António Carvalho, médico patologista. O serviço inclui ainda mais duas médicas patologistas, entre as quais a Dra. Ana Paula Castro, orientadora do estágio, e diversos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica. O serviço de Patologia Clínica está dividido consoante os diferentes sectores. Possui o laboratório de Bioquímica em conjunto com Hematologia, o laboratório de Microbiologia e o de Imunologia, onde o estágio foi realizado. O serviço responde como um todo a diversas áreas do hospital, pedidos de análises provenientes da consulta externa, da urgência, internamento e ambulatório.

Em ambos os locais, a manhã é essencialmente dedicada à colheita dos produtos para análise, à preparação dos equipamentos (manutenção, calibração e controlo) e à execução das análises, que se estende à parte da tarde. Durante a execução, é necessário prestar especial atenção aos aparelhos de forma a garantir a qualidade da execução técnica das amostras. Qualquer técnico superior deve ter em linha de conta que a qualidade do trabalho e o resultado requerem o conhecimento de todo o procedimento que a amostra está sujeita. Como tal, deve procurar acompanhar e realizar tarefas que correspondem à fase pré-analítica, como as colheitas, e à fase pós-analítica.

Fase pré-analítica

Um erro nesta fase é o mais comum num laboratório e leva a um erro no resultado final, pelo que tem que ser evitado impreterivelmente.⁽¹⁾ As amostras devem estar sob controlo com o objetivo de evitar contaminações, perdas ou alterações das mesmas.

Quando o utente se apresenta no laboratório, é aberta a sua ficha, ou criada se for um novo utente, na qual são registadas as análises pedidas na requisição e é dado um conjunto de etiquetas associadas a um número. É com este número que se identificam os tubos, frascos, zaragatoas, entre outros, com as etiquetas correspondentes.

Antes da realização da colheita deve-se proceder à preparação adequada do utente. O nome completo do utente deve ser confirmado de forma a evitar trocas, e este deve ser questionado se está em jejum e se trouxe algum produto biológico colhido pelo próprio, confirmando que respeita os critérios de aceitação do laboratório. Quando a amostra biológica não reúne estes critérios, deve-se explicar ao utente a importância de reunir os requisitos para a obtenção de resultados fiáveis. É igualmente importante saber se o utente está a fazer alguma medicação ou a tomar suplementos alimentares, com vista a construir uma breve história clínica que auxilia na interpretação dos resultados finais.

De forma a minimizar os erros associados à fase pré-analítica, o tempo de permanência do garrote não deve ser excedido, o volume de sangue no tubo deve ser adequado às indicações do mesmo e deve proceder-se à homogeneização, agitando suavemente o tubo, à exceção do tubo de soro.

Relativamente às colheitas realizadas nos postos, não podem ser efetuadas aquelas cuja execução deva ser imediata ou cujo resultado possa sofrer alterações com o transporte, pelo que se deve apelar ao utente a deslocação à sede do laboratório. As amostras devem ser transportadas dentro de arcas que mantenham uma temperatura baixa, controlada e registada através de *loggers*, e deve ser conservada numa arca refrigerada até ao momento da execução, ou congelada em algumas situações específicas.

Fase analítica

Esta fase compreende a execução técnica das análises pedidas. Antes da execução, é realizada a manutenção dos equipamentos, bem como a calibração e controlo de qualidade de forma a garantir a fidelidade dos resultados. Estando este processo finalizado, procede-se

à preparação das amostras (centrifugação, separação se necessário, entre outras) para posteriormente as colocar nos respetivos equipamentos.

Uma fonte de erro importante nesta fase é a falta de cuidado na preparação dos equipamentos, não respeitando a calibração e/ou controlo. Isto pode refletir-se numa falha nos resultados. A automatização permitiu diminuir a fonte de erros associada às técnicas manuais, custos e tempo das análises e permitiu também aumentar a exatidão e confiança dos resultados.⁽¹⁾

O laboratório está dividido em zonas consoante a área de análise e está equipada com os aparelhos que executam as análises. Além destes, o laboratório possui centrifugas para tubos de sangue e urinas, uma estufa essencialmente para os produtos destinados à Microbiologia, vários frigoríficos, quer para conservação das amostras quer para reagentes, controlos e calibradores.

Fase pós-analítica

Nesta fase é feita a avaliação final dos resultados através da validação, que é feita individualmente para cada análise e, posteriormente, para cada boletim de forma a ser observada a concordância entre os valores obtidos. Feita a validação, é emitido o boletim analítico para o utente levantar.

A aceitação de resultados é da responsabilidade do Diretor Técnico (DT). A validação analítica pressupõe a verificação do bom funcionamento do equipamento e conhecimento dos resultados do controlo de qualidade interno. Os resultados são validados ou sujeitos a repetição, na mesma amostra ou amostras diferentes, tendo em consideração, quando aplicáveis, a idade, sexo, relação com outros parâmetros analíticos, informação clínica, terapêutica e história do doente.

Controlo de Qualidade

Todos os laboratórios que executem exames laboratoriais devem ter em funcionamento um sistema de garantia de qualidade, traduzido em procedimentos escritos e abrangendo toda a organização do laboratório, as diferentes etapas das análises e sua execução, bem como a formação e qualificação dos diversos tipos de pessoal técnico e administrativo. O sistema da garantia da qualidade deve ser dinâmico e contínuo.⁽²⁾

O Controlo de Qualidade engloba o Controlo de Qualidade Interno e a Avaliação Externa da Qualidade. O Controlo de Qualidade Interno (CQI) é um conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas. É indispensável para a deteção de anomalias, avaliação de erros e sua imediata correção. É organizado pelo responsável pelo programa de garantia da qualidade.⁽²⁾ O CQI é efetuado diariamente antes do processamento das amostras, em todos os equipamentos e utilizando dois níveis de controlo de qualidade diferentes. O produto do controlo de qualidade deveria ser semelhante à amostra real. Assim, a situação ideal é aquela em que os calibradores, controlos e amostras geram a mesma resposta num sistema de medição.

Sempre que se inicia um novo lote ou novo *kit*, sempre que é feita uma calibração, após a manutenção do equipamento e/ou quando há alteração dos resultados, deve-se proceder ao controlo do equipamento. O resultado é registado, analisado e comparado com resultados do mesmo equipamento.

Além do CQI, o laboratório deve participar em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), de preferência nacionais, organizados por entidades de idoneidade reconhecida pela Comissão Técnica Nacional, sendo confidenciais os resultados individuais neles obtidos. A AEQ corresponde à avaliação, por um organismo exterior, da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório.⁽²⁾ Assim, permite a melhoria do desempenho do laboratório e comparação de resultados com outros laboratórios, o que conseqüentemente traz credibilidade ao trabalho desenvolvido.

Atividades desenvolvidas

Durante o tempo de estágio houve oportunidade de contactar com todas as diferentes valências das Análises Clínicas, especialmente no LAC Dr. Ferraz Alves. A automatização permite dar a resposta ao volume de amostras, pelo que se torna importante perceber o funcionamento de todos os equipamentos no laboratório.

Tabela I: Equipamentos existentes no LAC Dr. Ferraz Alves.

Equipamento	Método	Determinações
Olympus AU400	Ensaio fotométrico, cinéticos, enzimáticos e imuno-turbidimétricos	Bioquímica/Imunologia
Clinitek Atlas	Espectroscopia por refletância	Urina tipo II
Interlab G26	Separação eletroforética	Eletroforese proteínas
HA 8160	Cromatografia líquida de alta pressão	HbA1c
Immulate 2000	Quimiluminescência	Imunologia/Endocrinologia/Bioquímica
Advia: Centaur	Quimiluminescência direta	Imunologia/Endocrinologia/Bioquímica
Minividas	ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)	Imunologia (anticorpos)
Sysmex XT 1800i	Citometria de fluxo associada à fluorescência	Hemograma, plaquetas
TestI THL	Fotometria capilar de fluxo – análise cinética	Velocidade de sedimentação
Option 4 Plus	Densidade óptica	Provas de coagulação

I. Bioquímica

A Bioquímica é a área das análises clínicas onde o principal objetivo de estudo são as vias metabólicas e alterações nestas que originam estados patológicos. Nesta secção estão inseridas uma variedade de análises de rotina, requisitadas com muita frequência, como a glicémia, colesterol, proteínas totais, entre muitas outras, fundamentais ao metabolismo dos lípidos, glúcidos e proteínas.

São analisadas amostras de soro e urina. O sangue, colhido em tubos secos sem anticoagulante, é centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos com vista a obtenção do soro, que vai ser utilizado pelos equipamentos. Relativamente às urinas, estas podem ser de dois tipos. No caso da análise pedida ser urina tipo II ou urocultura, é colhida a primeira urina da manhã ou, caso não seja possível, com um intervalo de 3 horas. O outro caso corresponde às urinas colhidas num espaço de 24 horas para avaliação de diversos parâmetros bioquímicos, tendo em conta o volume total de urina colhido durante as 24 horas.

I.1 Equipamentos e métodos utilizados

Olympus AU400

A grande maioria dos parâmetros bioquímicos são doseados no equipamento Olympus AU400 (Beckman Coulter). Trata-se de um auto-analisador capaz de analisar componentes do soro e urina através da fotometria por medição da absorvância, que é diretamente proporcional ao que se pretende dosear.

As técnicas realizadas pelo auto-analisador podem ser divididas de acordo com o seu princípio teórico: ensaios cinéticos, ensaios fotométricos, ensaios enzimáticos, imunoturbidimétricos e possui ainda uma unidade ISE (Eléctrodo Seletivo de Iões) onde são determinadas espécies iónicas.

Diariamente da parte da manhã é feita a verificação dos reagentes, calibração dos mesmos quando necessário, e controlo de qualidade interno. Apenas após estes procedimentos é que as *racks* estão prontas a ser carregadas com amostras. Estas podem ser cinzentas para soro, vermelhas para urina e laranja para efetuar diluições. Assim, de acordo com o tipo de amostra, são colocadas no equipamento e o leitor faz a leitura do

código de barras de cada amostra, associado à informação sobre as análises a efetuar. A amostra é dispensada e há adição do reagente para que ocorram as respectivas reações.

O sistema informático fica em comunicação permanente com o equipamento. Os testes são executados mediante a identificação do número de tubo da amostra com o respetivo código de barras. O controlo da transferência de resultados para o sistema informático é feito por amostragem, comparando os resultados impressos no Olympus AU400 com os resultados evidenciados no ficheiro do utente.

Clinitek Atlas

Este equipamento consiste num sistema automatizado para análise de urinas. Destina-se à determinação de parâmetros físicos, como a cor e densidade, e parâmetros bioquímicos como a bilirrubina, eritrócitos, glucose, leucócitos, nitritos, pH, proteínas e urobilinogéneo, através do uso de tiras teste. Os parâmetros bioquímicos são quantificados através de refletância por comprimento de onda duplo, enquanto que a densidade e a cor utilizam a refratometria por reflexão e a análise de reflexão da luz, respetivamente.

As tiras teste estão fixadas num suporte e à medida que as amostras de urina são colocadas no carrossel, vão passando através das tiras.

HA 8160

A determinação em sistema automático da hemoglobina glicada (HbA1c) é efetuada neste equipamento, através da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A amostra de sangue total é diluída, hemolisada e a HbA1c lábil é removida, permitindo resultados precisos para HbA1c. A amostra é transferida para a coluna, onde as frações de hemoglobina são separadas. A coluna é composta por uma resina de troca catiónica de fase reversa. A leitura das frações é realizada a 415 nm e 500 nm com um fotómetro e os resultados são analisados através de um microprocessador.

Interlab G26

Este sistema automatizado destina-se à eletroforese de proteínas séricas, através da separação eletroforética em gel de agarose. As proteínas adquirem carga negativa e migram do ânodo para o cátodo a diferentes mobilidades quando sujeitas a um campo elétrico.

Aplica as amostras num gel de agarose, realiza a eletroforese, desnatura o gel, faz a coloração, descoloração e lavagem, seca o gel e lê a densidade ótica das tiras eletroforéticas.

1.2 Metabolismo proteico

Proteínas totais

O total de proteínas séricas consiste na soma de todas as proteínas em circulação (plasma ou soro). A quantificação de proteínas totais é útil no diagnóstico e tratamento de diversas doenças que envolvem o fígado, rins ou medula óssea, bem como outras perturbações metabólicas e nutricionais.

O aparelho efetua um ensaio de cor fotométrico, em que os iões cúpricos localizados numa solução alcalina reagem com proteínas e polipéptidos que contenham pelo menos duas uniões de peptídicas, de forma a produzir um complexo de cor violeta. A absorvância deste complexo medida a 540/660 nm é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra.

Um aumento das proteínas totais (hiperproteïnemia) observa-se em situações de desidratação, em que há uma ingestão de água inadequada ou perda excessiva de água por vômitos, diarreia, doença de Addison ou acidose diabética. A hiperproteïnemia pode ser ligeira e resultar de um aumento nas concentrações das proteínas presentes em concentrações baixas como as imunoglobulinas policlonais, numa infeção. Ou, por outro lado, pode ser acentuada e resultar de um aumento das imunoglobulinas monoclonais (por exemplo no mieloma múltiplo). Uma diminuição das proteínas totais (hipoproteïnemia) pode ocorrer por diminuição da síntese hepática de proteínas, aumento da excreção devido a lesão renal, distúrbios em que as proteínas não são absorvidas ou ingeridas de forma adequada, aumento da volémia, entre outras.⁽³⁾

Proteínas urinárias

Esta determinação tem importância no diagnóstico e tratamento de doenças renais geralmente associadas à proteinúria.⁽⁴⁾ A colheita para esta análise deve ser a urina de 24 horas, uma vez que a concentração de proteínas na urina varia durante o dia.

O aparelho realiza um ensaio de cor fotométrico que avalia a presença de proteínas plasmáticas na urina. O vermelho de Pirogallol é combinado com molibdato para formar um

complexo vermelho com uma absorvância máxima de 470 nm. Este complexo liga-se aos grupos amina das proteínas, formando um complexo azul púrpura com absorvância máxima a 600 nm e é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra.

O aumento das proteínas eliminadas na urina (proteinúria) pode ser devido a quatro situações distintas: por aumento da permeabilidade glomerular (proteinúria glomerular), sendo a albumina a principal proteína excretada; por defeito na reabsorção tubular (proteinúria tubular) que resulta na excreção essencialmente de proteínas de baixo peso molecular; por aumento da concentração de proteínas no plasma, como hemoglobinas ou proteína de Bence Jones (proteinúria de sobrecarga) ou por secreção anormal de proteínas no trato urinário (proteinúria pós-renal). O aumento de proteínas na urina também se pode observar em situações intermitentes como no decorrer do exercício físico ou num estado febril.⁽³⁾

Albumina

A albumina constitui cerca de 50% das proteínas plasmáticas presentes no plasma humano de indivíduos saudáveis. Trata-se de uma proteína sintetizada no fígado e é a maior responsável pela manutenção da pressão oncótica do plasma, pelo que tem um papel muito importante na distribuição de fluidos entre o compartimento extra e intracelular. Além disto, tem outras funções biológicas como transporte e armazenamento de diversos compostos.⁽⁵⁾

Neste ensaio de cor fotométrico, é formado um complexo corado quando o verde de bromocresol reage com a albumina. A absorvância deste complexo é medida bicromaticamente (600/800 nm) e é proporcional à concentração de albumina na amostra.

O aumento da albumina no plasma (hiperalbuminemia) verifica-se numa situação de desidratação severa e estase venosa excessiva, mas tem pouco significado clínico. A hipoalbuminemia pode resultar de uma síntese deficiente, aumento do catabolismo e perda de proteínas na urina e nas fezes. Níveis baixos de albumina são observados em doenças hepáticas, renais (síndrome nefrótico), desnutrição, doenças inflamatórias, entre outras.⁽³⁾

Proteína C Reativa (PCR)

A PCR é uma proteína de fase aguda positiva produzida pelo fígado e libertada para a circulação após algumas horas do início de uma reação inflamatória.⁽⁶⁾

O equipamento efetua um ensaio imuno-turbidimétrico, em que a amostra é misturada com tampão e solução anti-soro. A PCR reage especificamente com anticorpos PCR anti-humanos para produzir agregados insolúveis, cuja absorvância é proporcional à concentração de PCR na amostra.

Níveis elevados de PCR observam-se especialmente após um enfarte agudo do miocárdio, em situações de trauma, infecções bacterianas e virais, cirurgia e em neoplasias. (3) Consoante a prescrição médica, o resultado pode ser qualitativo (positivo ou negativo) ou quantitativo (valor numérico através do doseamento).

Imunoglobulinas

Tratam-se de glicoproteínas sintetizadas e excretadas pelos plasmócitos que participam na imunidade humoral do organismo, através da sua interação com antigénios. As que têm maior relevância clínica são a IgM, IgG e IgA.

A IgM é a primeira a responder à presença de antigénios, como tal, está associada à resposta imunitária primária. Circula na forma pentamérica e as suas funções na resposta imunitária são a aglutinação de patógenos e ativação da via clássica do complemento. A IgG, constituída por quatro subclasses, é a imunoglobulina mais abundante no sangue. Participa na defesa contra a invasão bacteriana e outros antigénios. A IgA é a imunoglobulina predominante em secreções como a saliva, lágrima, leite e mucosas e o seu papel passa por ligar os microrganismos nas mucosas.⁽⁷⁾

Neste ensaio imuno-turbidimétrico, as imunoglobulinas presentes na amostra reagem especificamente com os respetivos anticorpos anti-humanos, presentes numa solução anti-soro, formando complexos antígeno-anticorpo. A absorvância destes complexos é proporcional à concentração das imunoglobulinas na amostra.

A deficiência de IgM é rara e associada a infecções pirogénicas recorrentes. Os seus valores aumentados surgem em gamopatias monoclonais de Waldenström, linfoma maligno, gamopatias policlonais (cirrose biliar primária) e artrite reumatóide.

Relativamente à IgG, os valores encontram-se diminuídos numa agamaglobulinemia, no síndrome da imunodeficiência adquirida, como resultado de queimaduras, entre outros. Níveis aumentados podem ocorrer em gamopatias monoclonais como no mieloma múltiplo do tipo IgG, em linfomas, leucemias, em gamopatias policlonais, nas doenças imunes (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, síndrome de Sjogren), sarcoidose, entre outros.

Por fim, níveis reduzidos de IgA são observados no síndrome nefrótico, gastroenteropatas com perdas proteicas severas, leucemias linfoblásticas, síndrome de má absorção, hipogamaglobulinemia, entre outras. Níveis aumentados de IgA estão presentes em gamopatias monoclonais, como no mieloma múltiplo do tipo IgA, em gamopatias policlonais, na doença hepática crônica, infecções crônicas, especialmente do trato respiratório e gastrointestinal, entre outros.⁽³⁾

Eletroforese de proteínas no soro

A eletroforese de proteínas é efetuada no equipamento Interlab G26. As proteínas presentes no soro percorrem distâncias diferentes, formando um perfil eletroforético onde se pode observar a presença de cinco bandas distintas: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-globulinas e gama-globulinas. Tem valor no diagnóstico de certos processos inflamatórios agudos e crônicos, doenças malignas, doenças hepáticas ou renais, e patologias hereditárias.⁽⁸⁾

O perfil eletroforético pode ser normal, observando-se a presença das cinco bandas distintas (Figura 1), ou pode estar alterado por situações fisiológicas e patológicas, onde as bandas podem estar diminuídas, aumentadas, ausentes ou com mobilidade anormal (Tabela 2).

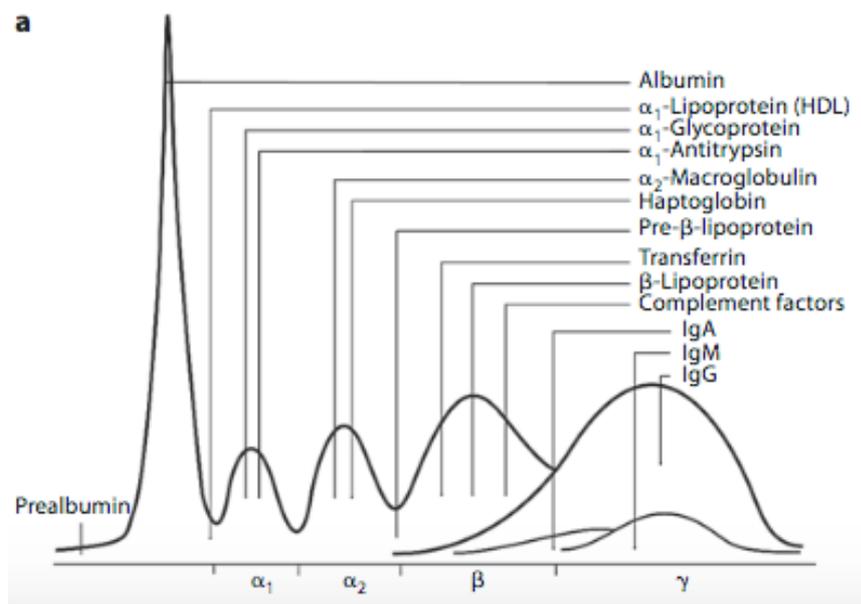
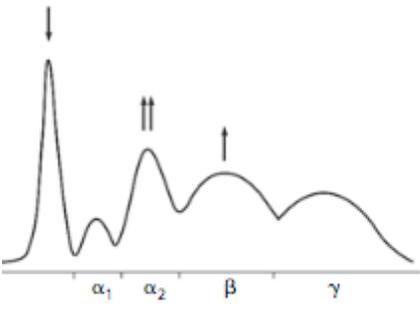
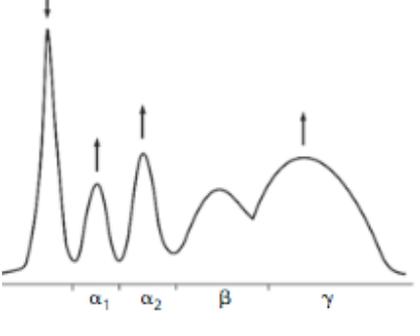
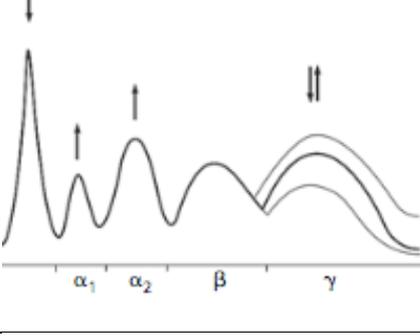
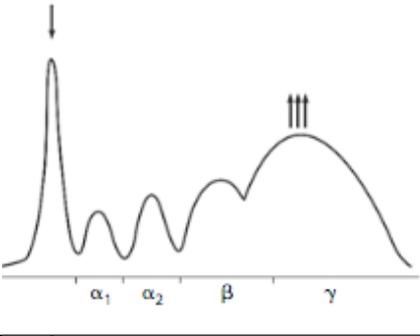
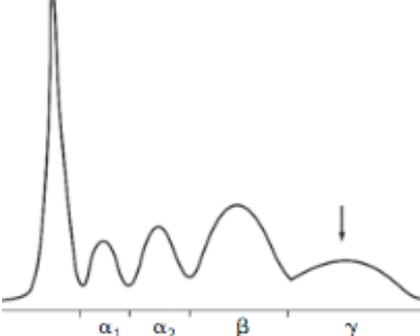


Figura 1: Traçado eletroforético normal numa eletroforese capilar.⁽⁸⁾

Tabela 2: Padrões eletroforéticos típicos de algumas situações patológicas.

<p>Síndrome nefrótico</p>		<p>Perda de proteínas de baixo peso molecular (\downarrow albumina e \downarrow γ-globulinas) e retenção de proteínas de alto peso molecular (\uparrow α-2-globulina).</p>
<p>Inflamação aguda</p>		<p>Aumento das α-1 e α-2-globulinas, quase sempre associados à diminuição da albumina. Quando o aumento das γ-globulinas está associado, significa que é crónica.</p>
<p>Tumores malignos</p>		<p>Aumento acentuado das α-1 e α-2-globulinas, devido ao aumento das proteínas de fase aguda. Diminuição γ-globulinas em estado terminal.</p>
<p>Falha hepática (cirrose, hepatite, p.e.)</p>		<p>Formação de ponte entre β-globulinas e γ-globulinas e diminuição da albumina. As α-1 e α-2-globulinas mantêm ou sobem ligeiramente.</p>
<p>Défice anticorpos</p>		<p>Pode envolver uma ou várias frações de imunoglobulinas, normalmente está associado a uma diminuição acentuada de γ-globulinas.</p>

I.3 Metabolismo Glicídico

Glicose

A glicose é uma das principais fontes de energia do organismo. A sua concentração no sangue varia entre limites bem estreitos, essencialmente devido à ação de diversas hormonas, sendo a insulina a principal interveniente. Após cada refeição, os níveis de glicose aumentam significativamente, começando a diminuir após uma hora. Os níveis atingem o valor mínimo basal antes da primeira refeição do dia, ou seja, em jejum. A glicémia pode ser medida em jejum (após 8 a 10 horas de jejum), a qualquer hora (amostra aleatória), após uma refeição (pós-prandial) ou como parte de uma prova de tolerância à glicose oral (PTOG). A medição da glicémia traduz a concentração de glicose no sangue, e a sua determinação é de extrema importância no controlo do distúrbio associado à hiperglicemia, a diabetes *mellitus*.⁽⁹⁾

Segundo a norma da DGS, o diagnóstico de diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para soro na população em geral:

- Glicémia de jejum ≥ 126 mg/dL (ou $\geq 7,0$ mmol/L);
- Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L);
- Glicémia ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTOG) com 75 g de glicose;
- Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.⁽¹⁰⁾

O diagnóstico de diabetes numa pessoa assintomática não deve ser realizado com base num único valor anormal de glicémia em jejum ou de HbA1c, devendo ser confirmado numa segunda análise após uma a duas semanas.⁽¹⁰⁾

Além do plasma, a determinação da glicose para diagnóstico ou controlo de diabetes também pode ser determinada na urina (glicosúria), pois a subida da glicose no sangue pode ultrapassar o limiar renal, e como consequência surge na urina.

Para determinar a glicose no sangue ou urina, o aparelho realiza um ensaio UV enzimático (método de hexocinase), em que a glicose é fosforilada pela hexocinase na presença de ATP e de iões de magnésio, para produzir glucose-6-fosfato e ADP. A glucose-6-fosfato desidrogenase oxida a glucose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato com a redução de NAD⁺ a NADH. O aumento da absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Relativamente à PTOG, esta avalia a *clearance* da glicose em circulação após uma administração oral de glicose definida e em condições controladas. É realizada especialmente em grávidas não diabéticas como rastreio de diabetes gestacional, ou em pessoas com valores de glicémia em jejum aumentados. É efetuada a medição de glicose em dois momentos, às 0 horas e ao fim de 2 horas, exceto para as grávidas, em que além destas é também medida ao fim de 1 horas. O método de doseamento da glicose é efetuado pelo método já referido. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional a confirmação de um ou mais valores:

0h – glicémia ≥ 92 mg/dL (ou $\geq 5,1$ mmol/L)

1h – glicémia ≥ 180 mg/dL (ou $\geq 10,0$ mmol/L)

2h – glicémia ≥ 153 mg/dL (ou $\geq 8,5$ mmol/L).⁽¹⁰⁾

Existe outro parâmetro que tem como finalidade efetuar a medição da concentração média de glicose nos últimos três meses, denominado por HbA1c (hemoglobina glicada). Quando os níveis de glicose no sangue estão elevados, parte da hemoglobina é sujeita a uma reação química não enzimática com a glicose em excesso. A primeira fase da reação entre a glicose e a hemoglobina é reversível e origina um composto intermediário denominado pré-A1c ou base de Schiff. A segunda fase da reação é irreversível e resulta num composto estável, denominado A1c. Como a quantidade de glicose ligada à hemoglobina é diretamente proporcional à concentração de glicose no sangue, e como os eritrócitos têm um tempo de vida médio de 120 dias, a medida da HbA1c pode fornecer uma avaliação do controlo da glicémia médio no período de 90 a 120 dias que antecedem a colheita.⁽¹¹⁾

O doseamento é feito através da técnica de HPLC no equipamento já descrito anteriormente, e é importante não só no momento de diagnóstico da diabetes, mas principalmente na monitorização do controlo glicémico em pacientes diabéticos a longo prazo. As vantagens desta análise passam por não ser necessário jejum, o valor não é afetado pela ingestão alimentar ou prática de exercício físico recente e tem maior estabilidade. As desvantagens estão relacionadas com as situações que alteram a vida média dos eritrócitos, como por exemplo anemias hemolíticas em que os resultados podem encontrar-se falsamente diminuídos ou nas anemias ferropénicas ou por défice de vitamina B12, em que os valores podem estar falsamente elevados.⁽¹²⁾ Os valores normais de HbA1c encontram-se entre os 4 e 6%.

De uma forma geral, um aumento das concentrações de glicose no sangue (hiperglicemia) traduz-se numa doença metabólica, diabetes *mellitus*, que pode apresentar 4 tipos distintos: tipo I, auto-imune que resulta na destruição de células β do pâncreas levando

a um déficit de insulina; tipo II, em que se desenvolve uma resistência à ação da insulina ou há defeito da sua secreção; gestacional, com anomalias no metabolismo da glicose a acontecerem na gravidez; associada a outras causas como defeitos genéticos da ação da insulina, doenças pancreáticas, entre outros.⁽¹⁰⁾ Outras doenças ou estados clínicos podem causar hiperglicemia, como hipertiroidismo, pancreatite, síndrome de Cushing, enfarte do miocárdio e traumatismo. Níveis reduzidos de glicose no sangue (hipoglicemia) em jejum estão associados a situações como ingestão de álcool, insulinomas, disfunção hepática, hipotiroidismo, síndrome de Reye, insuficiência renal crónica e septicémia.⁽³⁾

I.4 Metabolismo Lipídico

Os lípidos têm diversas funções no nosso organismo, funcionam como fonte de energia, estão envolvidos na digestão, desempenham funções hormonais e fazem parte da estrutura das membranas celulares.⁽³⁾ Os lípidos, como o colesterol e os triglicéridos, são insolúveis em água, e para poderem entrar em circulação são transportados associados a proteínas (lipoproteínas).⁽¹³⁾

Tanto os lípidos como as lipoproteínas têm um papel crucial no desenvolvimento da aterosclerose, envolvida nos problemas cardiovasculares como enfarte do miocárdio, AVC e doença vascular periférica. Assim sendo, a determinação de parâmetros lipídicos avalia o risco de doenças cardiovasculares.⁽³⁾

Colesterol

O colesterol é um componente essencial das membranas celulares e das lipoproteínas. Atua também como precursor para a síntese de hormonas esteroides e ácidos biliares. Uma parte do colesterol é derivada da alimentação, contudo a maioria é sintetizada no fígado e noutros tecidos.⁽³⁾ O valor preditivo individual da concentração de colesterol total em relação ao risco cardiovascular é reduzido, pelo que devem ser determinadas em paralelo as classes de lipoproteínas (particularmente LDL e HDL, que têm um papel contrário na patogénese da aterosclerose).

Trata-se de um ensaio de cor enzimático para determinação quantitativa de valores de colesterol no soro. Os ésteres de colesterol numa amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase. O colesterol livre produzido é oxidado pela enzima colesterol oxidase com produção simultânea de peróxido de hidrogénio. Este reage com a 4-aminoantipirina e

com fenol, na presença de peroxidase, para produzir um cromóforo. O produto final (corante vermelho de quinoneimina) é medido por espectrofotometria a 540/600 nm.

A concentração de colesterol total sérico depende de muitos fatores, entre os quais a idade, sexo, atividade física, doenças hepáticas e outras doenças metabólicas, e deve ser interpretado em conjunto com os outros parâmetros que avaliam o perfil lipídico.

Triglicéridos

Os triglicéridos são ésteres constituídos por três resíduos de ácidos gordos e um resíduo de glicerol. Podem ser adquiridos pela alimentação ou produzidos pelo próprio organismo no fígado. A maioria encontra-se no tecido adiposo, mas uma pequena quantidade circula no sangue e é usada como fonte de energia para os músculos.⁽³⁾ Esta determinação tem utilidade na classificação de vários distúrbios lipoproteicos genéticos e metabólicos e na avaliação de fatores de risco para a aterosclerose e doenças cardiovasculares. Esta avaliação deve ser feita em conjunto com os outros parâmetros do perfil lipídico.

O ensaio baseia-se numa série de reações enzimáticas conjuntas. Os triglicéridos da amostra são hidrolisados através de uma combinação de lipases microbianas, para produzir glicerol e ácidos gordos. O glicerol é fosforilado pelo ATP para produzir glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3-fosfato é oxidado através de oxigénio molecular para produzir peróxido de oxigénio e dihidroxiacetona. O peróxido de oxigénio formado reage com a 4-aminofezona e N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina, sal disódico, na presença de peroxidase para produzir um cromóforo, lido a 660/800 nm. A absorvância é proporcional à quantidade de triglicéridos presentes na amostra.

Colesterol HDL

O colesterol HDL corresponde ao colesterol ligado a lipoproteínas de alta intensidade (HDL), que removem o colesterol dos tecidos para o fígado, para ser metabolizado ou excretado. No fígado é transformado em ácidos biliares que são excretados para os intestinos através das vias biliares, sendo por este motivo que o colesterol HDL é considerado anti-aterogénico.⁽¹³⁾ Trata-se de um parâmetro que é importante monitorizar pois tem uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas e o risco de doença cardiovascular. Assim sendo, valores elevados, dentro dos valores de referência, são benéficos para o organismo.

É efetuado pelo equipamento um ensaio de cor enzimático, em que o anticorpo anti-lipoproteína- β -humana se liga às lipoproteínas (LDL, VLDL e quilomicrons) formando complexos antigénio-anticorpo, que ficam bloqueados e impedem a ação do sistema enzimático nestas lipoproteínas. Assim, só o colesterol HDL é quantificado. Este reage com água e oxigénio para formar colest-4-em-3ona, ácidos gordos e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio reage com a 4-aminoantipirina e com a N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxi-4 fluoroanilina (F-DAOS) para formar um corante azul medido a 600/800 nm, cuja absorção é proporcional à quantidade de HDL presentes na amostra.

Colesterol LDL

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) derivam das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e transportam a maioria do colesterol do fígado até aos tecidos, onde irá ser utilizado. Estas lipoproteínas são responsáveis pelos depósitos do colesterol nas paredes das artérias, formando as placas de aterosclerose. As LDL passam através do endotélio vascular e são retidas na matriz intercelular da íntima, onde são sujeitas à ação oxidativa de espécies químicas reativas sintetizadas pelas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos. As LDL oxidadas podem atrair monócitos em circulação, induzem a sua adesão ao endotélio, estimulam a formação de *foam cells*, a lesão de células endoteliais, a migração das células musculares lisas, interferem com a vasodilatação e promovem a trombose. Em concentrações elevadas, a permanência das LDL na íntima aumenta e conseqüentemente aumenta a exposição às espécies oxidantes.⁽¹⁴⁾ Desta forma, o colesterol LDL tem um valor preditivo clínico relevante para avaliar doenças cardiovasculares.

A determinação do colesterol LDL é calculada através da fórmula de Friedwald:
 $LDL \text{ (mg/dL)} = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicéridos} / 5 + \text{Colesterol HDL})$. Esta fórmula traduz resultados inválidos quando o valor dos triglicéridos é superior a 400 mg/dL.

Avaliação do perfil lipídico

Os valores de colesterol, triglicéridos, HDL e LDL constituem o perfil lipídico, e são relevantes na avaliação do risco de doenças cardiovasculares. Concentrações elevadas de lípidos traduzem-se por hiperlipoproteinémias e concentrações reduzidas por hipolipoproteinémias.⁽³⁾

As hiperlipoproteinémias podem ser classificadas de acordo com cinco fenótipos de

acordo com a classificação de Fredrickson:

Tabela 3: Classificação de hiperlipoproteínias.

Fenótipo	Lipoproteína elevada	Col.	Trig.	HDL	LDL	Associação clínica
I (raro)	QM	N a ↑	↑↑↑	N a ↓	N	Pancreatite aguda, dor abdominal, baixa incidência de DCV (doença cardiovascular) e aterosclerose
IIA (comum)	LDL	↑↑	N	N a ↓	↑↑	Risco aumentado de DCV
IIB (comum)	LDL, VLDL	↑↑	↑↑↑	N a ↓	↑↑	Risco aumentado de DCV
III (interm.)	IDL	↑↑	↑↑↑	N a ↓	N a ↓	Risco aumentado de DCV
IV (comum)	VLDL	N a ↑	↑↑	N a ↓	N	Risco aumentado de DCV
V (rara)	VLDL, QM	N a ↑	↑↑↑↑	N a ↓	N	Risco aumentado de DCV e pancreatite

Tabela 4: Classificação de hipolipoproteínias.

Fenótipo	Lipoprot. diminuída	Col.	Trig.	HDL	LDL	Associação clínica
Abetalipoproteinemia	LDL	↓↓↓↓	↓↓	N	ausente	Má absorção; deficiência mental; falha no crescimento
Hipobetalipoproteinemia	LDL	↓ a ↓↓↓↓	N	N	↓↓	Risco diminuído de DCV
Analfalipoproteinemia (Doença de Tangier)	HDL	N a ↓↓	N	ausente	N	Risco aumentado de hiperesplenismo e DCV
Hipoalfalipoproteinemia	HDL	N a ↓↓	N	↓↓	N a ↑↑	Risco aumentado de DCV

I.5 Função renal

Os rins exercem diversas funções biológicas, sendo as principais a formação de urina, excreção, manutenção da homeostase através da regulação do equilíbrio ácido-base e do equilíbrio hidro-eletrolítico, excreção de produtos do metabolismo e produção de hormonas. (3) A lesão renal pode evoluir para insuficiência renal crónica, embora o rim tenha a capacidade de aumentar a capacidade funcional em resposta à lesão.

A ureia, creatinina e ácido úrico são determinações analíticas que avaliam a função renal e refletem a função dos nefrónios, através da avaliação da taxa filtração glomerular (TFG). A TFG é definida como o volume plasmático de uma substância filtrada pelos rins por minuto. As determinações analíticas avaliam também a secreção e reabsorção tubular.⁽¹⁵⁾

Ureia

A ureia é o principal produto final do metabolismo proteico. É sintetizada no fígado, transportada pelo sangue até aos rins onde é excretada na urina por filtração glomerular, sendo uma mínima quantidade reabsorvida nos túbulos proximais. Apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo, não é reabsorvida ativamente, logo é um fraco parâmetro para avaliação da TFG pois cerca de 40-70% volta para o plasma por difusão passiva dependente do fluxo urinário.⁽¹⁵⁾

O equipamento efetua um ensaio UV cinético em que a ureia é hidrolisada na presença de água e urease para produzir amónia e dióxido de carbono. A amónia produzida reage com 2-oxoglutarato e NADH na presença de glutamato-desidrogenase para produzir glutamato e NAD⁺. A redução da absorvância de NADH por unidade de tempo é proporcional à concentração de ureia.

Os valores de ureia aumentados no soro podem ser resultado de uma perfusão renal diminuída (enfarte do miocárdio, choque ou insuficiência cardíaca congestiva), aumento do catabolismo proteico, desidratação, doenças renais (insuficiência renal crónica e aguda, glomerulonefrite) ou causas pós-renais por obstrução do fluxo urinário (tumores do aparelho urinário e da próstata, cálculos renais). Valores de ureia diminuídos não têm grande significado clínico na avaliação da função renal, podem surgir em jejum prolongado, numa dieta pobre em proteínas ou em doenças hepáticas graves.⁽³⁾

Níveis aumentados na urina podem surgir associados a um aumento do catabolismo proteico, dietas hiperproteicas ou hipertireoidismo, enquanto níveis reduzidos na urina são

observados na insuficiência renal e hepática, dieta pobres em proteínas e obstrução do trato urinário.⁽³⁾

Creatinina

A creatinina resulta do metabolismo da creatina e creatina-fosfato no músculo, numa reação irreversível a uma velocidade constante ao longo do dia. A quantidade de creatinina produzida depende da massa muscular do indivíduo e tem poucas variações com a dieta. A creatinina é filtrada no glomérulo pelo que os níveis sanguíneos de creatinina avaliam a capacidade de filtração dos glomérulos.⁽¹⁵⁾

O equipamento efetua um ensaio de cor cinético, em que a creatinina forma um complexo amarelo alaranjado com o ácido pícrico num meio alcalino, cuja absorvância a 520/580 nm é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

Um aumento dos níveis de creatinina no soro são sugestivos de problemas na função renal, como glomerulonefrites, pielonefrites, necrose tubular aguda, obstruções do trato urinário por cálculos, redução da perfusão renal, desidratação, insuficiência cardíaca congestiva, entre outros. Surge também aumentada temporariamente após lesões musculares. Uma redução dos níveis de creatinina normalmente são devido a causas fisiológicas, como a gravidez, perda de massa muscular e terapêutica com esteroides.⁽³⁾

A concentração sanguínea da creatinina é utilizada geralmente para determinar a capacidade da função renal, a gravidade da lesão renal e para monitorizar a progressão da doença renal. No entanto, é um parâmetro com baixa sensibilidade, sendo que a *clearance* da creatinina é mais sensível para detetar alterações da TFG. Desta forma, estes dois parâmetros analíticos devem ser determinados em paralelo.

Clearance da creatinina

A *clearance* da creatinina tem importância na avaliação da velocidade e da eficiência da filtração renal, pois baseia-se na excreção pelos rins da creatinina metabolicamente produzida. Este parâmetro é determinado através de um cálculo que necessita da medida da concentração da creatinina numa amostra de sangue e numa amostra de urina de 24 horas. A *clearance* da creatinina é calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{clearance da creatinina (mL/min)} = UV/P$$

U = concentração da creatinina urinária (mg/dL)

V = volume de urina excretado por unidade de tempo (mL/min)

P = concentração de creatinina plasmática (mg/dL)

A *clearance* da creatinina varia inversamente com a concentração de creatinina no soro, ou seja, quando a creatinina no soro é elevada, a *clearance* é diminuída, indicando um dano renal. Um aumento da *clearance* da creatinina pode ser observado ocasionalmente durante a gravidez, após exercício físico ou após a ingestão de grandes quantidades de carne.⁽³⁾

Ácido úrico

O ácido úrico é um composto nitrogenado abundante na urina e é o produto final do metabolismo de degradação das purinas (adenina e guanina). É excretado maioritariamente na urina, cerca de 75%, e o restante nos intestinos. O ácido úrico é completamente filtrado do plasma pelos glomérulos e secretado nos túbulos distais para a urina, embora a maioria seja reabsorvida nos túbulos proximais e reutilizada. Como é insolúvel no plasma, em concentrações elevadas pode depositar-se nas articulações e tecidos, causando inflamação e dor.⁽¹⁶⁾

O doseamento do ácido úrico é útil no diagnóstico de deficiências genéticas no metabolismo das purinas, na confirmação do diagnóstico e monitorização da gota, auxilia o diagnóstico de cálculos renais e disfunções renais.

É efetuado um ensaio de cor enzimático em que o ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína e peróxido de hidrogénio. Este reage com N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina, sal disódico (MADB) e 4-aminofenazona na presença de peroxidase para produzir um cromóforo, lido a 660/800 nm. A quantidade de corante formado é proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.

No soro, o ácido úrico não é considerado um bom parâmetro de avaliação da função renal devido à presença de alterações metabólicas ou alimentares que aumentam a concentração plasmática (hiperuricemia), sem que haja disfunção renal associada. A hiperuricemia surge nas doenças com catabolismo proteico aumentado (gota), doenças mieloproliferativas, quimioterapia, doenças renais (insuficiência renal crónica, envenenamentos por chumbo) e em defeitos enzimáticos específicos como a deficiência de hipoxantina-guaninafosforribosil transferase ou de glucose-6-fosfato. A hipouricemia pode ser consequência da diminuição da síntese (disfunção hepática aguda), deficiência tubular renal ou por ação de fármacos como a varfarina.⁽³⁾

Na urina, níveis elevados de ácido úrico são observados em situações como a gota, leucemias, linfomas, dieta rica em purinas e estão associados a um risco aumentado de formação de cálculos renais. Níveis reduzidos podem ocorrer em doenças renais, dieta pobre em purinas e alcoolismo crônico.

Microalbuminúria

A microalbuminúria traduz a presença de albumina em amostras de urina, em quantidades superiores ao normal, ou seja, superior a 30 mg/dia. A albumina encontra-se em grandes quantidades no sangue, mas quase nenhuma é eliminada na urina quando a função renal está normal. No entanto, quando há uma lesão ou doença renal, a albumina pode ser eliminada na urina.⁽¹⁷⁾

É efetuado um ensaio imuno-turbidimétrico, em que a albumina humana reage especificamente com anticorpos de albumina anti-humanos presentes numa solução anti-soro, formando agregados insolúveis cuja absorvância é proporcional à concentração de albumina na amostra.

A determinação de microalbuminúria numa urina de 24 horas é importante no controlo dos doentes com diabetes *mellitus*, uma vez que nestes doentes a albumina na urina indica nefropatia diabética. A microalbuminúria é um fator de risco da evolução para nefropatia clínica em doentes com diabetes *mellitus* tipo I, e representa também um risco aumentado de doença renal progressiva e mortalidade cardiovascular na diabetes *mellitus* tipo 2.⁽¹⁸⁾ A microalbuminúria também pode surgir em casos de exercício físico durante as 24 horas da recolha da urina, infeção, febre, insuficiência cardíaca congestiva, hiperglicémia e hipertensão graves.

Análise sumária de urina

A análise sumária de urina, ou urina tipo II, é um exame que surge com elevada frequência no laboratório. É útil na avaliação de doenças renais, mas também na rotina, por ser um indicador rápido do estado do indivíduo. A amostra deverá ser a primeira urina da manhã, uma vez que é a mais concentrada devido à retenção na bexiga durante a noite. Se não for possível, a última micção deverá ter sido com um intervalo de 3 horas.

Esta análise engloba dois tipos de determinações: o sedimento urinário, em que é feita uma estimativa semi-quantitativa do número de células epiteliais, eritrócitos, leucócitos,

cristais, cilindros, bactérias e leveduras presentes na amostra; e uma análise semi-quantitativa de alguns parâmetros bioquímicos como a bilirrubina, eritrócitos, glucose, leucócitos, nitritos, pH, proteínas e urobilinogéneo através de tiras-reagente destinadas para o efeito.

A cor da urina pode variar de incolor a preto, que traduz o resultado do metabolismo, da ingestão de compostos, de condições patológicas e da atividade física. A urina normal tem uma coloração amarela que resulta da excreção de urocromo (amarelo), uroeritrina (vermelho) e urobilina (laranja), podendo variar consoante o estado de hidratação do organismo. A presença de sangue na urina é uma das causas mais comuns de cor anormal, tornando a urina em tons de vermelho dependendo da quantidade de sangue e do pH.

A avaliação da capacidade de reabsorção renal é feita pela medição da densidade, que indica a concentração de substâncias químicas dissolvidas na urina em função do poder de excreção e concentração dos rins. Valores de densidade elevados podem ser sugestivos de desidratação, enquanto que valores diminuídos podem ser devido a uma ingestão aumentada de líquidos ou diuréticos.

O pH da urina é medido através de indicadores de pH na tira teste que alteram a cor entre pH 4,5 (verde bromocresol) e pH 9 (azul de bromoxelenol). Numa dieta rica em proteínas, jejum prolongado ou processos patológicos que conduzam a acidose metabólica, a urina fica com um pH mais ácido. Urinas com pH alcalino podem resultar de uma dieta pobre em proteínas ou processos patológicos que resultam em alcalose metabólica.

A deteção de níveis elevados de glucose na urina ocorre quando a glucose ultrapassa o limiar de reabsorção renal, como na diabetes *mellitus* ou quando os túbulos renais perdem a capacidade de reabsorver a glicose.

Os corpos cetónicos são detetados na urina em situações de baixa disponibilidade de glícidos como ocorre numa situação de jejum, febre, dietas ou excesso de exercício físico. Também pode ocorrer nos diabéticos em que a insuficiência de insulina impossibilita o normal metabolismo dos glícidos.

As proteínas na urina podem dever-se a várias situações, desde fisiológicas como exercício físico em excesso, desidratação ou *stress*, a causas mais graves como infeções urinárias, lúpus, glomerulonefrites e lesão renal. Se a quantidade de proteínas na urina for elevada, normalmente está associada a doença renal.

A presença de bilirrubina na urina é verificada em doenças hepáticas como a cirrose hepática, cálculos nos dutos do trato biliar, hepatites, obstrução biliar e hepatocarcinoma. Muitas vezes é a primeira indicação laboratorial de hepatopatia.

A presença de urobilinogénio na urina ocorre sempre que há aumento da destruição de eritrócitos ou dos seus precursores, como na anemia hemolítica e anemias megaloblásticas, respetivamente. Também é associada a doenças e disfunções hepáticas como a hepatite infecciosa e tóxica, cirrose hepática, entre outros.

A presença de nitritos na urina é indicativa da presença de bactérias com a capacidade de reduzir os nitratos presentes na amostra de urina a nitritos. Contudo, a ausência de nitritos na urina não elimina a presença de uma possível infeção do trato urinário, uma vez que nem todas as bactérias produzem enzimas redutoras de nitratos a nitritos.

A presença de sangue na urina pode indicar a presença de eritrócitos, hemoglobina ou mioglobina. Os eritrócitos ou hemoglobina surgem na urina em processos patológicos como a pielonefrite, síndrome nefrótica, litíase renal, cistite, entre outros. A mioglobina é decorrente de processos em que se verifica destruição de tecido muscular como traumatismos musculares, distrofia muscular progressiva, entre outros. A presença de leucócitos na urina é indicativa de infeção das vias urinárias.

1.6 Função hepática

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano e desempenha um papel bioquímico fundamental no metabolismo, digestão, desintoxicação e eliminação de substâncias do organismo. O fígado tem uma grande capacidade funcional que consegue regenerar células que tenham sido destruídas por lesões ou doenças, no entanto, se o tempo de exposição à lesão for elevado o fígado pode sofrer danos irreversíveis. Apesar do dano, a função do fígado é mantida na normalidade na maioria dos casos, sendo detetado através de determinações analíticas.⁽³⁾

As determinações analíticas para avaliação da função hepática são baseadas na avaliação essencialmente das funções excretoras e de síntese do fígado, e na avaliação da atividade de enzimas hepáticas libertadas para o plasma.

Aspartato aminotransferase (AST)

O AST, também designado por GOT, é uma das duas transaminases responsáveis pela formação de cetoácidos em aminoácidos pela transferência de grupos amina. Encontra-

se presente numa variedade de tecidos, tendo atividade mais elevada no fígado, no músculo cardíaco e no sistema músculo-esquelético.⁽¹⁹⁾

É efetuado um ensaio UV cinético em que a AST catalisa a transaminação de aspartato e 2-oxoglutarato, formando L-glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido em L-malato pelo malato desidrogenase, enquanto o NADH é convertido simultaneamente em NAD⁺. A redução na absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à atividade do AST na amostra.

O aumento de AST não é específico de dano no fígado, uma vez que esta enzima aumenta quando há lesão não só do fígado, mas também do musculo esquelético e cardíaco, rins e pâncreas. No entanto, níveis aumentados de AST podem ser detetados em hepatites agudas na maioria virais, doenças hepáticas associadas a necrose, cirrose hepática, colestase extra-hepática, carcinoma hepático, entre outros. A atividade da AST também se eleva após um enfarte do miocárdio, pelo que o seu doseamento pode ser útil na monitorização da evolução.⁽³⁾

Alanina aminotransferase (ALT)

A ALT, também designada por GPT, é a transaminase mais específica do fígado. Elevações nesta enzima raramente são encontradas em situações extra-hepáticas. Encontra-se presente no citoplasma dos hepatócitos, e quando os níveis estão aumentados significa que está a ocorrer uma deterioração da integridade da membrana dos hepatócitos.⁽¹⁹⁾

É efetuado um ensaio UV cinético em que a ALT transfere o grupo amino da alanina para o 2-oxoglutarato para formar piruvato e glutamato. O piruvato participa numa reação catalisada pelo LDH, com o NADH para produzir lactato e NAD⁺. A redução na absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é proporcional à atividade do ALT na amostra.

Níveis elevados de ALT podem ser detetados nas hepatites virais, hepatites tóxicas, cirrose, mononucleose infecciosa, carcinoma hepatocelular, colestase extra-hepática, lesões hepáticas após insuficiência cardíaca. Níveis moderados podem surgir após a ingestão de álcool ou drogas.⁽³⁾

Gama-glutamil transferase (γ GT)

A gama-glutamil transferase é uma enzima que catalisa a transferência de aminoácidos de um péptido para um aminoácido ou outro péptido. Está presente no túbulo proximal renal, fígado, pâncreas e intestino, no entanto, a enzima presente no soro é originada essencialmente do sistema hepatobiliar.⁽³⁾

É efetuado um ensaio de cor cinético em que a γ GT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil do substrato, gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilido, para a glicilglicina, produzindo 5-amino-2-nitrobenzoato. A alteração na absorvância a 410/480 nm deve-se à formação de 5-amino-2-benzoato e é diretamente proporcional à atividade da γ GT na amostra.

A γ GT surge aumentado em todas as formas de doença hepática, na colestase intra ou extra-hepática, carcinoma hepático, pancreatite e cirrose. Aumenta também em doentes com icterícia obstrutiva, colangite e colecistite, sendo que o aumento é mais precoce que a ALP. No entanto, um aumento da enzima também pode estar associado ao consumo de álcool em excesso ou administração de fármacos, pelo que nestas situações não tem significado patológico.⁽³⁾

Fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é uma enzima que está presente em quase todos os tecidos, especialmente no epitélio intestinal, túbulos renais, osteoblastos, fígado e placenta. A sua função está associada ao transporte de lípidos e calcificação dos ossos.⁽²⁰⁾

É efetuado um ensaio de cor cinético em que a atividade da ALP é determinada através da medição da taxa de conversão de p-nitro-fenilfosfato em p-nitrofenol, na presença de iões de magnésio e de zinco e de 2-amino-2-metil-1-propanol como aceitador de fosfato a pH 10,4. A taxa de alteração de absorvância decorrente da formação de p-nitrofenol é medida bicromaticamente a 410/480 nm e é diretamente proporcional à atividade de ALP na amostra.

A determinação deste parâmetro analítico é particularmente importante no estudo das doenças hepatobiliares e das doenças ósseas. Nas doenças hepatobiliares, a ALP encontra-se aumentada na obstrução intra e extra-hepática, obstrução intra-hepática do fluxo biliar e nas hepatites infecciosas. Nas doenças ósseas, os níveis de ALP encontram-se elevados na osteomalacia, raquitismo, carcinoma ósseo osteogénico e em doenças

secundárias dos ossos. A ALP placentária também pode surgir aumentada no terceiro trimestre da gravidez.⁽³⁾

Bilirrubina total

A principal fonte de bilirrubina é a hemoglobina proveniente da decomposição dos eritrócitos senescentes, que contribui com 80-85% da produção total. Os restantes 15-20% resultam da destruição prematura dos eritrócitos, na medula óssea, e do catabolismo de outras proteínas que contêm o grupo heme, como a mioglobina e o citocromo.⁽²¹⁾

É efetuado um ensaio de cor fotométrico em que a bilirrubina conjugada e a não conjugada reagem com um sal de diazônio estabilizado (tetrafluoroborato de 3,5-diclorofenildiazônio), na presença de um catalisador, para formar a azobilirrubina. A absorvância a 540 nm é proporcional à concentração de bilirrubina total.

O aumento da concentração de bilirrubina total deve-se ou a um aumento da não conjugada, ou da conjugada, ou de ambas. A hiperbilirrubinemia não conjugada inclui a anemia hemolítica, reações transfusionais, infeções virais e bacteriana, síndrome de Crigler-Najjar e síndrome de Gilbert. A hiperbilirrubinemia conjugada deve-se a obstruções do fluxo da biliar como a colestase, hepatite alcoólica, hepatite viral aguda, colangite, cirrose biliar, entre outros. É importante que as amostras não estejam hemolisadas, pois pode levar a resultados falsamente baixos.⁽³⁾

Bilirrubina conjugada

Como a bilirrubina é insolúvel no plasma, esta é transportada ligada à albumina até ao fígado, onde vai ser conjugada com o ácido glucorónico tornando-a hidrossolúvel (bilirrubina conjugada ou direta), que depois é eliminada na biliar.⁽²¹⁾

É efetuado um ensaio de cor fotométrico em que a bilirrubina conjugada reage com um sal de diazônio estabilizado, o 3,5-diclorofenil-diazônio-tetrafluorborato, num meio ácido para formar azobilirrubina. A absorvância a 570 nm é proporcional à concentração de bilirrubina conjugada na amostra.

1.7 Função pancreática

O pâncreas é um órgão localizado no abdómen que tem um papel fundamental no processo digestivo. Tem duas funções principais: exócrina, que envolve a produção de suco pancreático e enzimas para a digestão, e endócrina, que envolve a produção de hormonas, como a insulina e glucagon, envolvidas no metabolismo dos hidratos de carbono.⁽²²⁾

Existem diversas doenças pancreáticas, entre as quais patologias das células dos ilhéus pancreáticos (diabetes *mellitus*), insuficiência exócrina, patologias inflamatórias (pancreatite) e neoplásicas (adenocarcinomas), entre outras. Nestes casos, as determinações analíticas que avaliam a função pancreática são a amilase e a lipase.

Amilase

A α -amilase é uma enzima que pertence ao grupo das hidrolases que catalisam a hidrólise do amido e do glicogénio, sendo fundamental na digestão dos hidratos de carbono. Está presente em maior concentração nas glândulas salivares e no pâncreas.⁽³⁾

É efetuado um teste de cor cinético, em que um substrato reage com a α -amilase e os fragmentos com a α -glucosidase para uma libertação a 100% de p-nitrofenol. O aumento da absorvância a 410 nm é diretamente proporcional à atividade da α -amilase na amostra.

A amilase está presente no sangue e urina em pequenas quantidades. Quando há lesão das células dos órgãos produtores de amilase, como ocorre nas pancreatites, os níveis sanguíneos e urinários da enzima aumentam. No soro, muitas vezes a medição da amilase está associada à lipase para o diagnóstico e monitorização de pancreatites e doenças do pâncreas. Hiperamilasemia pode ocorrer em diversas situações, entre as quais a pancreatite aguda e crónica, mas também em patologias de outros tecidos, não é uma determinação específica de patologia pancreática. A amilase é filtrada no glomérulo e excretada na urina, pelo que na pancreatite observam-se níveis elevados na urina, muitas vezes mesmo antes da sua elevação no soro.⁽³⁾

Lipase

A lipase é produzida nas células acinares do pâncreas e catalisa a degradação dos triglicéridos da dieta em glicerol e ácidos gordos.⁽³⁾

É efetuado um ensaio de cor cinético em que a lipase pancreática hidrolisa os ésteres de ácidos gordos de cadeia longa dos respetivos triglicéridos. A atividade enzimática requer a presença de co-lipase. O 1,2-diglicérido específico do pâncreas é hidrolisado a 2-monoglicérido e ácido gordo. O 2-monoglicérido é medido através de reações enzimáticas acopladas catalisadas por lipase de monoglicérido, glicerol cinase, glicerol fosfato oxidase e peroxidase.

A sua determinação no plasma é útil para diferenciar patologias pancreáticas ou salivares como causa da elevação de amilase no plasma, pelo que é mais específica para o diagnóstico de pancreatite aguda. Quer a amilase quer a lipase aumentam nesta patologia, no entanto o aumento de lipase persiste durante mais tempo. Um aumento da lipase sanguínea pode surgir em patologias do trato biliar, obstrução do ducto pancreático, carcinoma pancreático e taxa de filtração glomerular diminuída. A lipase é uma molécula pequena filtrada nos glomérulos e é totalmente reabsorvida dos túbulos renais, pelo que normalmente não surge na urina.⁽³⁾

1.8 Metabolismo do ferro

O ferro está presente em pequenas quantidades na maioria das células do organismo, no plasma, e nos fluídos extracelulares. O organismo mantém as suas reservas de ferro, apenas cerca de 0,1% é eliminado. Participa numa série de processos como a oxidação celular, transporte de oxigénio para as células, produção de hemoglobina, mioglobina e algumas enzimas, entre outros.⁽³⁾

É absorvido na alimentação e é transportado pelo organismo pela transferrina. A maioria é necessária para a produção de eritrócitos, sendo incorporado na hemoglobina, enquanto que o restante é armazenado na forma de ferritina ou hemossiderina.

Ferro sérico

A concentração de ferro medida no soro é maioritariamente o Fe^{3+} ligado à transferrina, não inclui o ferro existente no soro como hemoglobina livre.⁽²³⁾

É efetuado um ensaio de cor fotométrico em que, num meio ácido, o ferro ligado à transferrina se decompõe em iões de ferro livres e apotransferrina. O ácido hidrocloreto e o ascorbato de sódio convertem os iões de ferro no estado ferroso. Os iões ferrosos reagem com um cromogéneo para formar um complexo azul medido bicromaticamente a 600/800

nm. O aumento da absorvância é diretamente proporcional à quantidade de ferro ligado à transferrina.

Um aumento da concentração de ferro ocorre nas doenças por excesso de ferro como na hemocromatose, múltiplas transfusões de sangue, envenenamento agudo por ferro nas crianças após ingestão de medicamentos com ferro e doenças hepáticas. Concentrações reduzidas de ferro no sangue são observadas em anemias por falta de ferro, em distúrbios inflamatórios crônicos, em infecções agudas como enfarte do miocárdio, hemorragias, gravidez tardia, entre outros.⁽³⁾

Ferritina

A ferritina é uma fonte de armazenamento de ferro rapidamente disponível. É encontrada em quase todas as células e o seu doseamento permite avaliar a quantidade de ferro armazenada no organismo. Variações na concentração de ferro refletem-se nos valores de ferritina.⁽²³⁾

É efetuado em ensaio imuno-turbidimétrico em que a ferritina presente na amostra aglutina com partículas látex revestidas com anticorpos anti-ferritina de coelho. É formado um complexo antigénio-anticorpo que difunde a luz em proporção à sua dimensão, cuja absorvância é lida espectralmente.

A ferritina diminuída é observada nas anemias por défice de ferro. Nesta patologia, quando o valor é normalizado significa que as reservas de ferro estão a ser reconstituídas. Por outro lado, a sua concentração está aumentada em doenças crónicas como a artrite reumatoide ou doença renal, leucemias, linfomas e hemocromatose.⁽³⁾

Transferrina

A transferrina é uma glicoproteína sintetizada maioritariamente no fígado que tem como função principal captar o ferro e transportá-lo pelo organismo. A sua síntese é inversamente proporcional à quantidade de ferro intracelular.⁽²³⁾

É efetuado um ensaio imuno-turbidimétrico em que a transferrina presente na amostra reage especificamente com anticorpos de transferrina anti-humanos, presentes numa solução anti-soro. São formados agregados insolúveis, cuja absorvância é proporcional à concentração de transferrina na amostra.

Níveis aumentados de transferrina observam-se em casos de carência de ferro, como nas anemias por falta de ferro, em hemorragias, durante a gravidez e na administração de estrogénios. Como a transferrina é uma proteína de fase aguda, nos estados inflamatórios surge diminuída. Também pode diminuir em condições associadas a um aumento de perda de proteínas, como no síndrome nefrótico, e na doença hepática crónica.⁽³⁾

1.9 Função cardíaca

Creatina cinase (CK)

A creatina cinase é uma enzima que catalisa a fosforilação reversível da creatina por ATP. Apresenta-se na forma de dímero, cujas subunidades M (músculo) e B (cérebro) originam três isoenzimas: CK-MM (músculo esquelético), CK-MB (coração) e CK-BB (cérebro). A presença de CK no sangue provem principalmente dos músculos.⁽³⁾

É efetuado um ensaio UV cinético em que a CK catalisa reversivelmente a transferência de um grupo de fosfatos do fosfato de creatina para ADP, formando creatina e ATP. O ATP é utilizado para produzir glicose-6-fosfato e ADP a partir da glicose. A glicose-6-fosfato é oxidada através da ação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase com redução simultânea da coenzima NADP para fornecer NADPH e 6-fosfogluconato. A proporção do aumento da absorvância a 340/660 nm, devido à formação de NADPH, é diretamente proporcional à atividade de CK na amostra.

Os níveis sanguíneos de CK elevam-se quando há uma lesão do músculo-esquelético ou do músculo cardíaco. As lesões do músculo esquelético que elevam a CK são principalmente as da distrofia muscular progressiva, do tipo Duchenne. Relativamente ao músculo cardíaco, a CK encontra-se elevada após um enfarte agudo do miocárdio e situações de trauma cardíaco como cirurgia. A atividade de CK total também pode aumentar na angina de peito, choque cardiogénico, miocardite, taquicardia, entre outros. Resultados falsamente positivos podem surgir com exercício físico intenso e com o uso de estatinas.⁽³⁾

Lactato desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase é uma enzima que catalisa a oxidação reversível do L-lactato em piruvato, utilizando NAD⁺ como aceitador de hidrogénio. Encontra-se em quase todas as células do organismo, mais especificamente no citoplasma, e é elevada numa situação de lise celular. A atividade de LDH total reflete um doseamento geral das suas cinco isoenzimas:

LDH-I (músculo cardíaco, eritrócitos, rim, células germinativas), LDH-2 (músculo cardíaco, eritrócitos, rim), LDH-3 (pulmões e outros tecidos), LDH-4 (leucócitos, nódulos linfáticos, músculo e fígado) e LDH-5 (fígado e músculo esquelético).⁽²⁴⁾

É efetuado um ensaio UV cinético em que o LDH catalisa a oxidação do lactato a piruvato juntamente com a redução de NAD⁺ a NADH. O aumento de NADH é medido a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade enzimática na amostra.

Os níveis de LDH encontram-se elevados em diversas situações como resultado da sua distribuição generalizada nos tecidos. Assim, podem surgir elevados no músculo cardíaco após enfarte agudo do miocárdio, miocardite, insuficiência cardíaca; no fígado numa hepatite viral ou tóxica; no músculo esquelético numa distrofia muscular progressiva; nos eritrócitos na presença de hemólise; nos rins numa glomerulonefrite crônica ou lúpus eritematoso sistêmico. Os resultados podem surgir falsamente positivos em situações de exercício físico intenso.⁽³⁾

1.10 Metabolismo mineral e ósseo

Cálcio total

O cálcio é um composto mineral essencial ao bom funcionamento dos músculos, nervos e coração. É necessário na coagulação do sangue e na formação dos ossos. Cerca de 99% encontra-se nos ossos, o restante está distribuído pelos tecidos moles e pelo líquido extracelular.⁽²⁵⁾ O cálcio encontra-se no sangue em três formas: livre ou ionizado (cerca de 50% corresponde à fração fisiologicamente ativa), cerca de 40% ligado a proteínas e 10% complexado.

É efetuado um ensaio de cor fotométrico em que os íons de cálcio reagem com Arsenazo III para formar um complexo roxo intenso. A absorvância do complexo é medida bicromaticamente a 660/700 nm e o seu aumento é diretamente proporcional à concentração de cálcio na amostra.

A hipercalcemia é devida principalmente ao hiperparatireoidismo primário e tumores ósseos, mas também pode ocorrer por excesso de vitamina D, sarcoidose, hipertireoidismo, tuberculose e transplantação renal. Valores de cálcio acima dos valores normais têm como consequência uma excitabilidade neuromuscular diminuída e fraqueza muscular. A hipocalcemia tem como principal causa a hipoalbuminemia, em que há redução da ligação do cálcio à albumina. Outras causas são a insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, diminuição

da ingestão de cálcio, deficiência de vitamina D, entre outros. A hipocalcemia tem como consequência tetania muscular.⁽³⁾

Fosfato

Os fosfatos são fundamentais para a produção de energia, função muscular e nervosa e crescimento ósseo. A maioria do fosfato no soro existe na forma inorgânica, sendo esta a determinação analítica efetuada.⁽³⁾

É efetuado um ensaio UV fotométrico em que o fosfato inorgânico reage com molibdato para formar um complexo heteropoliácido. A utilização de um surfatante elimina a necessidade de preparação de um filtrado isento de proteínas. A absorvância a 340/380 nm é diretamente proporcional à concentração de fosfato inorgânico na amostra.

A hiperfosfatemia normalmente está associada a uma insuficiência renal aguda ou crônica, como consequência de uma diminuição da excreção urinária de fosfato. Um aumento do fosfato também pode ocorrer no hipoparatiroidismo, acromegalia, intoxicação por vitamina D, entre outros. A hipofosfatemia é provocada por uma ingestão inadequada de fosfato ou absorção reduzida. Algumas causas estão associadas ao raquitismo, osteomalacia, defeitos na reabsorção tubular, hipertiroidismo, entre outros.⁽³⁾

Magnésio

O magnésio é um catião intracelular encontrado na maioria das células, sendo que cerca de 55% do magnésio total está presente nos ossos. É essencial em diversas reações enzimáticas importantes, onde funciona como co-fator ou ativador. Desempenha também um papel importante na glicólise, fosforilação oxidativa, respiração celular, transporte de cálcio membranar, entre outros.⁽²⁶⁾

É efetuado um ensaio de cor fotométrico em que os íons de magnésio formam um complexo colorido com azul de xilidil numa solução básica. A cor produzida é medida bicromaticamente a 520/800 nm e é proporcional à concentração de magnésio na amostra.

Os níveis baixos de magnésio no sangue podem resultar de uma baixa ingestão de magnésio, perda por diarreias, pancreatite aguda, perda urinária na diabetes *mellitus*, alcoolismo, entre outros. Um aumento das concentrações de magnésio ocorre sobretudo nas insuficiências renais agudas ou crônicas onde há diminuição da excreção, e também em situações em que há ingestão excessiva de magnésio.⁽³⁾ Amostras de soro hemolisadas

podem originar resultados falsamente positivos, pois os eritrócitos contêm uma quantidade superior de magnésio que o soro.⁽³⁾

1.1.1 Eletrólitos

Os eletrólitos afetam a maioria dos processos metabólicos das células, tendo como funções a manutenção da pressão osmótica e a hidratação de vários compartimentos de fluidos corporais, manutenção do pH adequado, regulação das funções cardíaca e muscular, participação como co-fatores de várias enzimas e envolvimento em reações de oxidação-redução.

As determinações analíticas de sódio, potássio e cloro são efetuadas no módulo ISE, que inclui elétrodos de membrana para a determinação do sódio e potássio, e uma membrana de PVC orientada a nível molecular para a determinação do cloreto. É desenvolvido um potencial elétrico de acordo com a equação de Nernst para cada ião específico. Quando comparado com uma referência interna, este potencial elétrico é convertido em voltagem e seguidamente na concentração de iões na amostra.

Sódio (Na⁺)

O sódio é o principal catião extracelular e desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio osmótico e da eletroneutralidade. O organismo utiliza o sódio não só para controlar a pressão sanguínea e o volume sanguíneo, mas também para o bom funcionamento dos músculos e nervos.⁽²⁷⁾

No soro, a hiponatremia pode resultar de uma ingestão diminuída ou perda de Na⁺ (vómitos, diarreia, sudorese excessiva), de um aumento de volémia (insuficiência cardíaca crónica, diabetes descontrolado, desnutrição) e no síndrome inadequado da hormona anti-diurética (SIADH). A hipernatremia normalmente resulta de perdas de água não proporcionais à perda de Na⁺ (desidratação, diurese osmótica, vómitos, diarreia), mas também pode ser devido a aumento da ingestão de sódio, síndrome de Cushing e diabetes insípido.⁽³⁾

Relativamente à urina, aumento dos níveis de sódio observam-se na terapêutica com diuréticos, no síndrome de Addison, nefrite com perda de sal e no SIADH. Uma diminuição dos níveis está associada a uma baixa ingestão de Na⁺ na dieta, insuficiência cardíaca congestiva e hiperaldosteronismo.⁽³⁾

Potássio (K⁺)

O potássio é o principal catião intracelular e participa em inúmeros processos bioquímicos. Desempenha um papel indispensável na manutenção da pressão osmótica celular. Cerca de 90% do potássio ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo 80% excretado pelos rins, e o restante, pelas fezes.⁽²⁸⁾

No sangue, o potássio encontra-se em pequenas concentrações, sendo que pequenas variações na sua concentração, por menores que sejam, podem ser significativas. A hipocaliemia pode ser resultado de uma ingestão insuficiente (situação rara), alteração da sua distribuição do líquido extracelular para o intracelular, perdas digestivas ou urinárias. Por outro lado, a hipercaliemia tem como causa mais frequente a insuficiência renal, mas também pode ocorrer na acidose metabólica, nas anemias hemolíticas graves, cetoacidose diabética, desidratação, entre outros.⁽³⁾

O potássio pode ser eliminado através dos rins, pela urina e em casos raros os seus níveis poderão estar anormalmente baixos devido a uma ingestão de quantidades insuficientes na dieta ou a doença renal. A excreção urinária de potássio pode vir aumentada no hiperaldosteronismo primário e secundário, doenças renais primárias, entre outras.⁽³⁾

Cloreto (Cl⁻)

O cloreto é o principal anião extracelular. É importante na manutenção da neutralidade eletroquímica do líquido extracelular, incluindo o plasma. A maior parte do cloreto ingerido é absorvido, e o excesso é eliminado pelos rins.⁽²⁹⁾

Concentrações diminuídas de cloretos no soro estão presentes em algumas situações como a cetoacidose diabética, insuficiência renal, alcalose metabólica, acidose respiratória, doença de Addison, vômitos prolongados, sudorese excessiva e hiperaldosteronismo. A hipercloremia ocorre geralmente em casos de desidratação, contudo, também pode ocorrer na acidose tubular renal, insuficiência renal aguda, acidose metabólica, alcalose respiratória e diabetes insípido.⁽³⁾

2. Microbiologia

A valência de Microbiologia compreende os estudos bacteriológicos, micológicos, parasitológicos e virológicos de diversos tipos de amostras biológicas, como urina, sangue, expetoração, líquido, lavado brônquico, entre outros. O objetivo deste setor passa pelo estudo de possíveis infecções que estejam a causar patologia, através da identificação dos microrganismos responsáveis e da forma de os erradicar.

As amostras são recebidas no laboratório, são verificadas as condições de aceitação e, após introdução dos pedidos no sistema informático, efetua-se o processamento das mesmas. Assim, consoante o tipo de produto efetua-se a sementeira nos meios mais apropriados, faz-se o esfregaço e neste é executada a coloração. Após o crescimento, é feita a avaliação macroscópica das culturas para posteriormente se proceder à identificação do microrganismo e respetivo teste de sensibilidade antimicrobiana.

2.1 Equipamentos e métodos utilizados

MicroScan WalkAway 96 plus

Este equipamento totalmente automatizado efetua a identificação e a suscetibilidade a antimicrobianos, com concentração mínima inibitória (CMI). Faz a incubação da suspensão bacteriana por um período de tempo apropriado, adiciona os reagentes e executa a leitura dos painéis. Através da metodologia colorimétrica, utiliza um espectrofotómetro modificado com seis comprimentos de onda e fibras óticas que faz a leitura dos painéis cromogéneos. A metodologia fluorimétrica é utilizada para a leitura dos painéis rápidos fluorogénicos.

O painel é colocado no equipamento com um código de barras associado a cada amostra. O equipamento está sincronizado com o computador, onde os dados são armazenados para posterior análise.

Bact/Alert 3D

Este equipamento automatizado faz a incubação, agitação e monitorização de frascos de hemoculturas, que contêm a amostra de sangue do doente inoculado em meios aeróbios ou anaeróbios. O sistema faz leituras periódicas e o crescimento microbiano na amostra é detetado pela da produção de CO₂ resultante da metabolização dos substratos existentes

no meio de cultura. Se houver produção de CO₂, a cor do sensor existente no fundo de cada frasco muda para uma cor mais clara. Caso não haja produção de CO₂, ao final de sete dias a amostra é considerada negativa. Para as amostras positivas, é realizada a identificação do microrganismo e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Câmara de fluxo laminar

Este equipamento é utilizado na manipulação de amostras biológicas ou de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Mycobacterium tuberculosis* ou *Neisseria meningitidis*, de forma a assegurar a manutenção de ar estéril na zona de trabalho aliada à elevada proteção do operador.

2.2 Colheita, transporte e conservação das amostras

A colheita, transporte e conservação das amostras deve respeitar os procedimentos das normas implementadas, de forma a garantir um resultado fiável. Uma falha em qualquer uma destas etapas pode dificultar o isolamento do microrganismo patogénico responsável pela infeção e pode levar ao crescimento de outros microrganismos contaminantes.

As amostras devem, sempre que possível, ser colhidas antes de ser instituída a terapêutica antibiótica e no local onde haja maior probabilidade de isolamento do microrganismo patogénico, de forma a evitar a contaminação com a flora comensal. Outra forma de evitar este tipo de contaminação é o uso de material e/ou recipiente estéril. O recipiente deve ser adequado à sobrevivência do agente etiológico suspeito e deve ser vedado até à sua manipulação. O volume de amostra deve ser sempre tido em conta, pois pode influenciar os estudos e a qualidade do resultado final.⁽³⁰⁾

Os produtos biológicos colhidos devem ser transportados ao laboratório o mais rapidamente possível de forma a garantir a sobrevivência dos microrganismos e prevenir o crescimento de microrganismos contaminantes. Se necessário, devem ser utilizados meios de transporte específicos. Até à manipulação, as amostras devem ser guardadas à temperatura ambiente no caso de fezes e amostras respiratórias, devem ser refrigeradas (2 a 8°C) se forem zaragatoas, cateteres, urinas e amostras de sangue para pesquisa de vírus, e devem ser colocadas em estufa no caso de se tratar de líquido cefalorraquídeo ou de amostras de sangue para cultura de bactérias.

Quando as amostras chegam ao laboratório, deve-se verificar se vêm colhidas no recipiente ou no meio adequado, se estão devidamente identificadas e se acompanhadas da requisição clínica e se têm volume suficiente para as determinações.⁽³⁰⁾

2.3 Testes de identificação microbiológica

Existem diversos testes disponíveis no laboratório de forma a auxiliar e clarificar a identificação dos microrganismos. É efetuado um exame macroscópico em todos os produtos biológicos, onde se observa o aspeto da amostra, o cheiro e a cor. Com base nisso, são escolhidos os meios de cultura e os testes a efetuar. Para a maioria dos produtos é feito um exame microscópico direto, observando-se ao microscópio ótico a flora microbiana presente e a quantidade de leucócitos, eritrócitos e células epiteliais. Este exame pode ser a fresco, feito numa suspensão da amostra biológica em soro fisiológico, ou após coloração de um esfregaço feito no momento do processamento da amostra. A coloração depende do tipo de amostra e do pedido efetuado pelo médico.

A coloração de Gram é das mais úteis e a mais usada, uma vez que classifica as bactérias em dois grandes grupos, as de Gram positivo (roxas) e as de Gram negativo (rosa), de acordo com as diferenças estruturais das paredes celulares. As bactérias de Gram positivo têm uma parede celular mais rica em peptidoglicano, o que permite a retenção do corante cristal violeta face às bactérias de Gram negativo. Esta coloração serve de diagnóstico presuntivo do microrganismo, permite avaliar a qualidade da amostra e permite orientar para a identificação definitiva.

Outra coloração utilizada com frequência é a de Ziehl-Neelsen, que permite distinguir bacilos ácido-álcool resistentes de outras bactérias, uma vez que estes possuem ácido micólico na parede celular que retém o corante vermelho. Esta coloração é realizada em todos os pedidos de pesquisa de micobactérias.⁽³¹⁾

O teste da catalase permite distinguir *Staphylococcus* spp., que são catalase positiva (há formação de bolhas de oxigénio) dos *Streptococcus* spp., que são catalase negativa. Dentro dos estafilococos, quando surgem colónias sugestivas de *Staphylococcus aureus*, faz-se o teste para identificação de *S. aureus* (Pastorex Staph Plus). Trata-se de um teste de aglutinação rápido que faz a deteção simultânea do fator de afinidade para o fibrinogénio, da proteína A, e dos polissacarídeos capsulares do *S. aureus*.

Dentro do grupo dos *Streptococcus* spp., está disponível um teste para confirmação de *Streptococcus pneumoniae* (Slidex pneumo-Kit). Esta bactéria possui antigénios capsulares que

são identificados por partículas de latex sensibilizadas por anticorpos anti-antigénio *Streptococcus pneumoniae*. Se o antigénio estiver presente, o reagente de latex é aglutinado e a suspensão deixa de ter aspeto homogéneo.

O teste da oxidase é útil na distinção das bactérias que são oxidase positiva (não fermentadores como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp., entre outras) das bactérias oxidase negativa (enterobactérias). Para as bactérias oxidase positiva, o local da inoculação da bactéria vira para roxo.⁽³¹⁾

O teste da optoquina serve para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* de outros α -hemolíticos. Os pneumococos são sensíveis à optoquina, pelo que surge inibição do crescimento em gelose de sangue.⁽³¹⁾

O teste de grupagem para a identificação de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A, B, C, D, F, G permite fazer a distinção das colónias com β -hemólise. Estes *Streptococcus* possuem antigénios específicos de grupo que podem ser extraídos e identificados com anti-soros. Assim, o reagente constituído por partículas de látex sensibilizado por anticorpos dirigidos contra os antigénios, é adicionado aos antigénios correspondentes e ocorre a formação de uma aglutinação visível das partículas de látex.

Para colónias sugestivas de *Salmonella* numa coprocultura, está disponível um teste de aglutinação, o Difco Salmonella O Poly A-I e Vi Antisoro. O reagente é um anti-soro polivalente que é adicionado ao microrganismo previamente colocado numa lâmina, e em caso de positividade origina uma floculação ao fim de três minutos. Este resultado deve ser confirmado por galerias bioquímicas.

Existem diversas galerias de identificação de microrganismos consoante o aspeto no crescimento nos diferentes meios. Assim, para colónias sugestivas de *Streptococcus* spp. ou *Enterococcus* spp. em gelose de sangue, por exemplo, efetua-se um ID32 Strept. Para as sugestivas de *Staphylococcus* spp., encontra-se disponível um ID32 Staph. Para colónias suspeitas de *Branhamella catarrhalis* em gelose de sangue, ou *Neisseria* spp. ou *Haemophilus* spp. em gelose chocolate, é efetuado um API NH. Para colónias sugestivas de enterobactérias ou outros bacilos de Gram negativo não fastidiosos, efetua-se um ID32E. Relativamente aos fungos, está disponível uma galeria específica para a sua identificação, denominada por ID32C.

Para identificação de bactérias anaeróbias, como *Bacteroides* spp. ou *Clostridium* spp. é efetuada uma galeria própria para anaeróbios, o ID32A. É necessário que as colónias estejam em cultura pura com 24 a 48 horas de incubação. Caso a cultura não seja pura, faz-se um

isolamento antes da identificação, em meio de Schaedler. Para *Corynebacterium* spp., está também disponível uma galeria API específica.

Para identificação de cocos de Gram positivo e bacilos de Gram negativo (fermentadores e não fermentadores), é necessária a existência de uma colônia isolada de uma cultura pura, com 12 a 48 horas de incubação, para haver crescimento abundante. Caso a cultura não seja pura, faz-se novamente um isolamento no meio mais adequado ao crescimento do agente etiológico provável. Para proceder à identificação, retira-se uma colônia isolada da gelose, prepara-se uma suspensão que é colocada na placa (combinado ou painel). Os combinados são introduzidos no aparelho MicroScan WalkAway, que faz a identificação e também o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Cada combinado possui testes bioquímicos que medem a utilização da fonte de carbono, a resistência e a atividade enzimática. Baseado nas reações químicas, o aparelho fornece o resultado sempre que possível em tempo útil.

2.4 Testes de sensibilidade a antimicrobianos (TSA)

O antibiograma efetuado em placa (Mueller Hinton simples ou sangue) utiliza o método de Kirby-Bauer. São retiradas colônias isoladas do meio onde cresceram após 18 a 24 horas de incubação, e é efetuada uma suspensão cuja turvação varia consoante o microrganismo e o TSA. Trata-se de um método de primeira linha para *Streptococcus* do grupo B, *Streptococcus pneumoniae*, e de um método alternativo ou confirmatório para *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Haemophilus* spp.

Existe também o antibiograma disponível em galerias para algumas situações. O ATB HAEMO é utilizado para determinar a sensibilidade de *Haemophilus* spp. e *Moraxella catarrhalis* aos antibióticos em meio semi-sólido, em condições muito próximas das técnicas de referência de diluição em gelose ou de micro-diluição. O mesmo acontece para o ATB ANA, utilizado para determinar a sensibilidade das bactérias anaeróbias estritas. O ATB UR, tem como finalidade determinar a sensibilidade das enterobactérias de origem urinária aos antibióticos. Por fim, o ATB PSE é utilizado para determinar a sensibilidade aos antibióticos de *Pseudomonas* spp. e outros não fermentadores.

Nestes casos, as galerias têm na parte superior um controlo de crescimento, e ao longo da galeria estão disponíveis os diferentes antibióticos. Se surgir uma turvação, significa que há resistência bacteriana; se não surgir turvação, significa que é sensível.

Tabela 5: Antibióticos mais comuns nos diferentes produtos biológicos.

Bactérias	Antibióticos
<i>Enterobacteriaceae</i>	Infeções urinárias: ampicilina, amoxicilina + ac. clavulânico, gentamicina, cefuroxima, ciprofloxacina, cotrimoxazol, nitrofurantoina, fosfomicina (estes dois últimos apenas na urina).
<i>Salmonella</i> spp. / <i>Shigella</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina + ac. clavulânico, cotrimoxazol, ciprofloxacina.
<i>Pseudomonas</i> spp. E outras não enterobactérias	Ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, tobramicins, piperacilina + tazobactam (naturalmente resistentes à ampicilina, amoxicilina + ác. clavulânico, cotrimoxazol).
<i>Streptococcus</i> spp.	Penicilina, ampicilina, amoxicilina + ác. clavulânico, cefotaxima, levofloxacina, cotrimoxazol (exceto hemoculturas), piperacilina + tazobactam, clindamicina, eritromicina.
<i>Streptococcus</i> grupo B	Ampicilina, eritromicina, clindamicina.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina, amoxicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cefotaxima, levofloxacina, cotrimoxazol.
<i>Staphylococcus</i> spp.	Oxacilina (para testar suscetibilidade às penicilinas resistentes à penicilase), penicilina, levofloxacina, eritromicina, clindamicina, cotrimoxazol (exceto hemoculturas).
MRSA	Vancomicina, daptomicina, teicoplanina, linezolid (naturalmente resistente aos β -lactâmicos, cefalosporinas, carbapenemes).
<i>Enterococcus</i> spp.	Ampicilina, ciprofloxacina, levofloxacina, tetraciclina, nitrofurantoina (urinas), daptomicina (são naturalmente resistentes às cefalosporinas e aminoglicosídeos).
<i>Haemophilus</i> spp.	Ampicilina, amoxicilina + ác. clavulânico, tetraciclina, cotrimoxazol, azitromicina, claritromicina.
BLEA (β -lactamases espectro alargado)	Tira BLEA (PM/PML > 8), aztreonam, amoxicilina + ác. clavulânico, ceftazidima, piperacilina + tazobactam.
Anaeróbios de Gram positivo	Ampicilina, amoxicilina + ác. clavulânico, piperacilina + tazobactam, clindamicina, meropenem.
Anaeróbios de Gram negativo	Amoxicilina + ác. clavulânico, piperacilina + tazobactam, clindamicina, meropenem.

2.5 Meios de cultura

Consoante o tipo de amostra biológica que chega ao laboratório, o CHTMAD possui uma lista pré-definida dos diferentes meios de cultura onde a amostra deve ser semeada.

Tabela 6: Meios de cultura utilizados no CHTMAD.

Produto	Meios de Cultura	Gram	Ziehl
Urina	CLED, MacConkey	x	
Hemocultura positivas	MacConkey, Gelose Sangue, MRSA ChromID	x	
Exsudado vaginal (grávida)	Gelose Sangue, Strepto B ChromID, caldo Todd Hewitt		
Exsudado vaginal (não grávida) 1	Gelose Sangue, Candida ChromID, Gelose Chocolate polyViteX VCAT3	x	
LCR	Gelose Sangue, Gelose Chocolate polyViteX	x	
Cateter	Gelose Sangue		
Zaragatoa orofaringe	Gelose Sangue, caldo Todd Hewitt		
Zaragatoa ocular	Gelose Sangue, Gelose Chocolate polyViteX		
Zaragatoa nasal	Gelose Sangue, MRSA ChromID		
Zaragatoa ouvido	Gelose Sangue, Gelose Chocolate Haemophilus, Gelose CNA, Candida ChromID		
Zaragatoa ferida/úlceras	MacConkey, Gelose Sangue, Gelose CNA, MRSA ChromID		
Fezes	MacConkey, Gelose Yersinia, Gelose MacConkey com Sorbitol (SMAC), Gelose Salmonella-Shigella (SS), Campyloset, caldo GN		
Líquido turvo	MacConkey, Gelose Sangue, MRSA ChromID, Gelose Schaedler, Tioglicolato	x	x 2
Líquido límpido	Gelose Sangue		
Pus	MacConkey, Gelose Sangue, MRSA ChromID, Gelose Schaedler, Tioglicolato	x	x 2
Expetoração / Secreção brônquica	MacConkey, Gelose Sangue, Gelose Chocolate Haemophilus, MRSA ChromID, Candida ChromID	x	x 2
Aspirado / Lavado brônquico	MacConkey, Gelose Sangue, Gelose Chocolate Haemophilus, MRSA ChromID, Candida ChromID	x	x
Dreno	Tioglicolato		
Esperma	MacConkey, Gelose Sangue, Candida ChromID, Gelose Chocolate polyViteX, Gelose Chocolate polyViteX VCAT3	x	

1 – exame a fresco

2 – se pedir BK

- CLED: meio de cultura enriquecido, destinado especialmente às urinas, onde crescem todos os agentes patogênicos e contaminantes urinários. A proliferação indevida de espécies de *Proteus* é evitada, devido à ausência de eletrólitos. A coloração do meio muda de verde para amarelo quando crescem fermentadores da lactose, e a cor é mantida caso o crescimento seja de bactérias não fermentadoras.

- MacConkey: meio seletivo e diferencial que permite o isolamento e diferenciação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos de Gram negativo. As bactérias de Gram positivo são inibidas pela presença de cristal de violeta. Os microrganismos fermentadores da lactose produzem ácido que, na presença do indicador vermelho neutro, resulta na formação de colônias rosa. Os não fermentadores da lactose formam colônias incolores.

- Gelose de Sangue: meio diferencial dos vários tipos de microrganismos e não seletivo, rico em nutrientes que facilitam o isolamento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos. Possui coloração vermelha devido à presença de sangue de carneiro, o que permite a determinação da hemólise, auxiliando a identificação bacteriana (a título de exemplo, *Streptococcus pneumoniae* produz α -hemólise, com coloração esverdeada à volta da colônia; *Streptococcus pyogenes* produz β -hemólise, com zona clara à volta da colônia).

- MRSA ChromID: meio cromogéneo seletivo para identificação direta de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente. As colônias de MRSA crescem de cor verde no meio, enquanto que as colônias que são sensíveis à metilicina são inibidas.

- Strepto B ChromID: meio cromogéneo seletivo para identificação direta de *Streptococcus* do grupo B (*Streptococcus agalactiae*). As colônias crescem com um tom rosa no meio. A maioria das outras bactérias não cresce neste meio, mas, se crescerem, não adquirem a cor rosa característica.

- Caldo Todd Hewitt: meio líquido altamente nutritivo utilizado para o cultivo de *Streptococcus* β -hemolíticos. Caso o meio fique turvo sugere o crescimento de microrganismos.

- Candida ChromID: meio cromogéneo utilizado para o isolamento seletivo de fungos. Permite a identificação direta de *Candida albicans*, que no meio apresenta colônias azuis, e

orienta para a identificação de *C. tropicalis*, *C. lusitanae* e *C. kefir* no caso das colónias serem rosa. Além disto, permite também o crescimento de *C. kruzi* e de fungos filamentosos.

- Chocolate polyViteX VCAT3: meio seletivo para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*. É composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) e por uma associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir as outras bactérias e fungos associados.

- Chocolate polyViteX: meio de isolamento para bactérias fastidiosas composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X e V. É particularmente recomendado para o crescimento de estirpes de *Neisseria*, *Haemophilus* e *Streptococcus pneumoniae*.

- Chocolate Haemophilus: meio seletivo para o isolamento das diferentes espécies de *Haemophilus* spp. a partir de amostras polimicrobianas, normalmente com flora associada. É composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X e V e por uma combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos, que permitem a seletividade do meio.

- CNA: meio de isolamento seletivo de bactérias fastidiosas que permite o crescimento de bactérias de Gram positivo. A maioria das bactérias de Gram negativo e *Bacillus* spp. são inibidas pelo ácido nalidíxico e colimicina.

- Yersinia: meio que permite o isolamento seletivo para deteção e diferenciação de espécies de *Yersinia* spp. a partir de amostras de fezes. A fermentação do manitol na presença de vermelho neutro resulta no crescimento de colónias rosa escuro a vermelho, características “olho-de-boi”.

- SMAC (MacConkey com sorbitol): meio seletivo para isolamento diferencial de *Escherichia coli* O157:H7, responsável por infeções gastrointestinais. A presença de sorbitol e de telurito permite a sua diferenciação através de colónias incolores com centro castanho. As outras *Escherichia coli* que fermentam o sorbitol originam colónias rosa a vermelhas.

- SS: meio de isolamento seletivo e diferencial para isolamento de bacilos entéricos patogénicos, especialmente *Salmonella* e *Shigella*. À semelhança do meio MacConkey, os fermentadores da lactose formam colónias rosa e os não fermentadores são incolores, como

a *Salmonella* e *Shigella*. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio, observado nas colónias com centro negro, como é o caso da *Salmonella*.

- Campyloset: meio para isolamento seletivo de *Campylobacter* spp. intestinal (*C. jejuni* e *C. coli*) a partir de amostras de fezes. As colónias destas bactérias são pequenas e acinzentadas e, por vezes, estendem-se ao longo de estrias de inoculação. É colocado numa jarra de anaerobiose, um recipiente hermético onde a atmosfera de anaerobiose é conseguida por um sistema gerador de dióxido de carbono (envelope com ácido ascórbico).

- Caldo GN: meio de enriquecimento seletivo para cultivo de microrganismos de Gram negativo de amostras de fezes.

- Schaedler: meio de isolamento destinado à deteção de bactérias anaeróbias estritas e facultativas. Permite um isolamento não seletivo de anaeróbios e um isolamento seletivo de bacilos anaeróbios de Gram negativo, particularmente de espécies de *Bacteroides* e *Prevotella*. É colocado num saco selado juntamente com um indicador descartável da anaerobiose. As placas são colocadas numa atmosfera anaeróbia, a 37°C durante pelo menos 48 horas e no máximo 7 dias até serem consideradas negativas.

- Tioglicolato: meio líquido muito nutritivo utilizado para a cultura de microrganismos anaeróbios, microaerofílicos e aeróbios, em amostras provenientes de locais estéreis. Se ao fim de 24-48 horas o meio se apresentar turvo, é repicado para meios sólidos para observar o tipo de crescimento bacteriano.

2.6 Urina

As infeções urinárias são das infeções mais comuns na população. A urina normal é estéril, mas pode ser contaminada com microrganismos comensais de outras partes do organismo. Normalmente as infeções urinárias estão associadas a bactérias intestinais. A urina colhida diretamente da bexiga tem um menor número de microrganismos, em caso de infeção.⁽³¹⁾

Os agentes etiológicos associados a infeções agudas são geralmente as enterobactérias, sendo que a mais comum é a *Escherichia coli*, mas também podem ser

causadores de infeção o *Proteus* spp., a *Klebsiella* spp., entre outras. Outras bactérias de Gram negativo também podem ser responsáveis, como *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*, e ainda bactérias de Gram positivo, como *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*. As urinas podem ainda estar colonizadas por leveduras como a *Candida albicans*, no entanto só devem ser valorizadas se a cultura for pura.

As amostras de urina para exame bacteriológico devem ser colhidas após descontaminação da zona íntima com água e sabão, e devem chegar ao laboratório o mais rapidamente possível sem refrigeração. Dada a quantidade de urinas para as quais seria necessário fazer lâmina para coloração de Gram, pondera-se a sua execução e viabilidade, optando pela não realização face ao tempo requerido para tal. É efetuado um exame cultural e um exame microscópico a fresco do sedimento.

Após homogeneização das urinas, estas são semeadas em meio de CLED e MacConkey, por esgotamento total do inóculo com a ansa de 1 μ L. As sementeiras são incubadas na estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em aerobiose, entre 18 a 24 horas. Após este período, é observada a presença ou ausência de crescimento bacteriano e/ou fúngico.

A valorização clínica das amostras é feita de acordo com o número de células epiteliais, leucócitos e eritrócitos obtidos no sedimento e com a contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) diretamente da placa. Para a observação do sedimento urinário, utiliza-se o microscópio ótico na objetiva de 10x para fazer a contagem de células epiteliais e observação de possíveis cilindros. Posteriormente, com a objetiva de 40x é feita a contagem de leucócitos, eritrócitos e observa-se a presença de fungos, se existirem. Relativamente à contagem de UFC, 1 colónia corresponde a 1000 UFC/mL (10^3), 10 colónias corresponde a 10000 UFC/mL (10^4) e 100 colónias corresponde a 100000 UFC/mL (10^5). Quando a cultura é pura e a contagem de UFC é igual a 10^5 (ou $10^3/10^4$ em alguns casos particulares), procede-se à identificação do microrganismo e TSA no equipamento MicroScan WalkAway. Caso se trate de uma cultura polimicrobiana, deve ser sugerido o envio de nova amostra para repetição.

O laboratório dispõe de dois ensaios imunocromatográficos rápidos *in vitro* para a deteção do antigénio *Streptococcus pneumoniae* e do antigénio *Legionella pneumophila* na urina de pacientes com pneumonia e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite (no primeiro caso).

2.7 Sangue

O estudo de bactérias no sangue é efetuado através de hemoculturas. O sangue é colhido por punção venosa, é introduzido nos frascos próprios de hemocultura, disponíveis para microrganismos aeróbios e anaeróbios, que são colocados no equipamento Bact/Alert 3D, onde são incubados.

Quando uma amostra é dada como positiva, faz-se o exame direto e o exame cultural. O exame direto consiste na execução de um esfregaço e coloração de Gram. Para o exame cultural, as amostras são semeadas em gelose de sangue, MacConkey e MRSA ChromID e incubadas $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose ou anaerobiose, consoante o tipo de frasco positivo, durante 24 horas. Após esse período e não se tratando de um falso positivo, observa-se o tipo de crescimento bacteriano na placa e procede-se à identificação e TSA no equipamento MicroScan WalkAway 96 plus.

É fundamental e com elevada importância clínica diferenciar culturas positivas (bacteriemia) de culturas contaminadas ou falsos positivos. Existem vários condicionantes que podem ajudar na distinção, como a identidade do microrganismo isolado, o número de hemoculturas positivas, tempo até à sua positividade, quantidade de crescimento, história clínica do doente, e local da punção venosa. Os microrganismos mais comuns causadores de bacteriemia são o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., entre outras. Os microrganismos que geralmente são contaminantes são o *Staphylococcus* coagulase negativo, *Bacillus* spp., *Streptococcus* do grupo viridans, entre outros.⁽³²⁾ No caso de hemoculturas pediátricas positivas com crescimento em placa, deve efetuar-se a identificação do microrganismo e TSA não só para microrganismos patogénios mas também para microrganismos contaminantes.

2.8 Exsudado vaginal

A flora normal da vagina apresenta uma grande variedade de bactérias e leveduras. O microrganismo predominante é o *Lactobacillus* spp., particularmente na idade adulta. Estes mantêm o pH ácido através da produção de ácido láctico, pelo que inibem o crescimento da maioria dos outros microrganismos. O fungo *Candida albicans* também faz parte da flora normal. A proliferação anormal deste e a diminuição de *Lactobacillus* levam ao desequilíbrio da flora normal da vagina. Além disso, outros microrganismos não pertencentes à flora

normal podem provocar infecções vaginais, como a *Neisseria gonorrhoeae* ou a *Trichomonas vaginalis*.⁽³¹⁾

As amostras que chegam ao laboratório são zaragatoas com exsudado vaginal, introduzidas no meio de transporte de Stuart. É efetuado um exame direto a fresco do esfregaço para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*; um esfregaço para coloração de Gram onde se faz a contagem do número de células epiteliais, se observa a presença ou ausência de flora bacteriana e de “clue cells” sugestivas de infecção por *Gardnerella vaginalis* (vaginose bacteriana); um exame cultural nos meios de cultura apropriados e, no caso das grávidas, num meio de cultura específico para o crescimento de *Streptococcus* do grupo B. Esta pesquisa tem interesse para detetar a colonização da mucosa vaginal por esta bactéria durante a gravidez, uma vez que durante o parto pode ocorrer a transmissão vertical causando pneumonia, septicémia ou meningite no recém-nascido.⁽³³⁾

2.9 LCR

A colheita de LCR é efetuada por profissionais especializados através de punção lombar, e é colhido para recipientes estéreis, vedados e transportados de imediato ao laboratório, sem refrigeração.⁽³⁰⁾

Assim que chega ao laboratório, o exame macroscópico dita o aspeto e a cor do produto. O aspeto normal do LCR é claro e incolor. Efetua-se um exame citológico, a fresco, para contagem de elementos celulares como leucócitos e eritrócitos, e, quando requisitado, efetua-se um exame a fresco com tinta da china para pesquisa de *Cryptococcus neoformans* (a cápsula do fungo fica evidenciada). É também efetuado um esfregaço para coloração de Gram, caso seja necessário.

Após centrifugação do produto, este é semeado nos meios apropriados que são incubados a 37°C durante 24 horas, em aerobiose e atmosfera de CO₂. A observação das placas é feita durante três dias, só no final deste período a amostra é dada como negativa na ausência de crescimento bacteriano. Tratando-se de um líquido estéril, não será de esperar crescimento bacteriano. Se ocorrer, na maioria dos casos trata-se de meningite e os microrganismos associados são *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e, em alguns casos, *Haemophilus influenzae*.

2.10 Cateter

Os cateteres são amostras importantes para averiguar a possível responsabilidade deste na origem de um quadro de bacteriemia. Devem chegar ao laboratório num contentor seco e devem ter o tamanho apropriado para efeitos de valorização. Este é semeado numa gelose de sangue, por rolamento no meio de cultura. Após incubação a 37°C em aerobiose durante 24 horas, é observada a ausência ou presença de crescimento bacteriano. A amostra é dada como positiva se crescerem, no mínimo, 15 colónias, e é dada como negativa se não houver crescimento suficiente durante dois dias.

Todo o tipo de crescimento bacteriano acima de 15 colónias deve ser valorizado, pelo que se deve proceder à identificação e antibiograma. Na maioria dos casos, o crescimento está associado a contaminações, como por exemplo, *Staphylococcus coagulase* negativo.

2.11 Zaragatoa

As zaragatoas podem ser provenientes de diversos locais do organismo, mas as mais comuns para exame bacteriológico são as zaragatoas da orofaringe, nasal, ouvido e ferida e/ou úlcera. Em todos os casos, estas chegam ao laboratório no meio de transporte adequado (Stuart) e, consoante o local de onde foi colhida, é semeada nos meios apropriados.

As zaragatoas da orofaringe são enriquecidas no caldo Todd Hewitt, que permite o cultivo de *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A de Lancefield (*Streptococcus pyogenes*), associados a infeções do trato respiratório superior. A zaragatoa nasal normalmente está associada a fins epidemiológicos para pesquisar portadores de *Staphylococcus aureus* (quer seja metilina resistente ou não), mas quando requisitado também são utilizados meios para pesquisa dos microrganismos associados a infeções do trato respiratório superior, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolítico do Grupo A, *Streptococcus pneumoniae*, entre outros menos comuns. As zaragatoas de feridas ou úlceras são semeadas nos meios apropriados para pesquisa de eventuais microrganismos patogénicos associados a alguma infeção, como enterobactérias, MRSA, entre outros.

2.12 Fezes

A flora normal do trato digestivo é constituída na grande maioria por anaeróbios estritos e uma percentagem mais baixa de anaeróbios facultativos, como *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Candida albicans*. Isto significa que em condições de aerobiose a maioria da flora não cresce, com exceção das enterobactérias.

No exame macroscópico, observa-se a consistência das fezes (formadas ou líquidas) e a presença ou ausência de muco ou sangue. Isto orienta os tipos de teste a efetuar e o diagnóstico do agente responsável pela infeção.

O exame bacteriológico de fezes é normalmente orientado para a pesquisa de bactérias dos géneros *Salmonella* e *Shigella*, pelo que são semeadas em meios próprios para o isolamento destas bactérias. Caso cresçam colónias sugestivas destas bactérias, normalmente com aspeto incolor na gelose MacConkey, estas são isoladas para posteriormente se efetuar um ID32E para identificação e se concluir acerca da presença ou ausência de um microrganismo patogénico.

As fezes são também inoculadas em meio de enriquecimento líquido (caldo GN) para cultivo de microrganismos de Gram negativo entéricos, que posteriormente é repicado para os meios SS e MacConkey. São também utilizados meios para isolamento de *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter* spp. (42°C, atmosfera microaerofílica durante três dias). Quando na gelose Campyloset crescem colónias sugestivas de *Campylobacter* spp., é efetuado um Gram diretamente das colónias para se observar os bacilos de Gram negativo em asa de gaivota. Caso se observem, é efetuado o teste da oxidase e da catalase, que serão positivos para *Campylobacter* spp.

Quando o exame parasitológico de fezes é requisitado, a colheita de fezes deverá ser de três amostras em contentores apropriados, e quando chegam ao laboratório são também sujeitas a um exame macroscópico, mas desta vez também se procuram elementos parasitários, como vermes adultos ou fragmentos dos mesmos. Após um método de concentração por sedimentação, é efetuado o exame microscópico a partir do sedimento, mais limpo, livre de resíduos lipofílicos e com os elementos parasitários em maior concentração, caso estejam presentes.

Estão disponíveis no laboratório alguns testes rápidos para pesquisa de vírus nas fezes. A pesquisa de Adenovírus e Rotavírus pode ser requisitada quando se suspeita de gastroenterite de origem viral, especialmente em crianças. O laboratório dispõe de um teste imunocromatográfico para a deteção destes vírus em amostras de fezes.

Existe também um teste para pesquisa do antígeno e das toxinas A e B de *Clostridium difficile*, através de um ensaio imunoenzimático rápido de membrana. Este microrganismo está associado a diarreias nosocomiais, pois o uso de antibioterapia reduz a flora intestinal endógena normal e conseqüentemente há a proliferação de microrganismos patogênicos endógenos ou contaminação exógena. As toxinas levam a uma colite pseudomembranar, e são marcadores da presença da bactéria.⁽³⁴⁾

Está também disponível no laboratório um teste para pesquisa de sangue oculto nas fezes. Este teste é utilizado para detetar indícios de distúrbios gastrointestinais, como cancro do cólon. Trata-se de um teste rápido imunocromatográfico para a deteção qualitativa de hemoglobina humana.

2.13 Líquido

Os líquidos que chegam ao laboratório para exame bacteriológico podem ser provenientes de diferentes locais. A grande maioria são líquidos pleurais, peritoneais, pericárdicos, articulares e líquidos de drenagem. O aspeto normal dos líquidos é transparente, e neste caso apenas é semeado numa gelose de sangue. Caso o líquido apresente um aspeto turvo, são escolhidos outros meios para isolamento de possíveis bactérias. Em ambos os casos o líquido é centrifugado antes da sementeira.

Como os líquidos são estéreis, o crescimento bacteriano nas placas deve ser valorizado pois podem traduzir alguma infeção corrente. Além da sementeira nos diferentes meios, também é inoculado o meio líquido tioglicolato, muito nutritivo para o crescimento de anaeróbios. Ao final de um ou dois dias na estufa, deve ser verificada a turvação do tioglicolato para fazer a repicagem para gelose de sangue e/ou Schaedler.

2.14 Pus

As amostras de pus que chegam ao laboratório podem ser colhidas por zaragatoa ou por seringas de aspiração. É realizado um exame direto, onde se faz a observação microscópica do esfregaço após coloração de Gram para avaliação de leucócitos, células epiteliais e ver se há flora bacteriana associada. É realizado também o exame cultural, nos meios de cultura apropriados, em aerobiose e/ou anaerobiose, dependendo do local de proveniência e do tipo de estudo pretendido. A valorização do crescimento bacteriano depende também destes fatores em concordância com o que foi observado no Gram.

2.15 Expetoração e outras amostras respiratórias

São vários os microrganismos potencialmente patogênicos que fazem parte da flora normal do trato respiratório superior. No entanto, a flora normal predominante suprime o crescimento dos potenciais patogênicos competindo com estes por nutrientes. O trato respiratório inferior não possui flora normal devido aos mecanismos de defesa. Estes englobam a produção de muco, existência de cílios, produção de tosse, entre outros, que tornam a remoção de microrganismos bastante eficiente.⁽³¹⁾

Podem surgir no laboratório alguns tipos de amostras diferentes para o estudo de infecções do trato respiratório, como expetorações, secreções brônquicas, aspirados e lavados brônquicos. Todas as amostras devem ser colhidas para um recipiente estéril de boca larga, de preferência logo pela manhã, uma vez que durante a noite há acumulação de secreções.

Em primeiro lugar, são efetuados esfregaços para coloração de Gram e/ou para coloração de Ziehl-Neelsen, dependendo da análise pedida na requisição. A observação do Gram é recomendada antes da observação das sementeiras, pois este permite avaliar a qualidade da amostra, tendo em conta a presença de leucócitos, células epiteliais e o predomínio de microrganismos. Na observação através da ampliação de 10x, as amostras que contêm no mínimo 25 leucócitos e no máximo 10 células epiteliais são consideradas boas amostras. Amostras que contêm mais de 25 células epiteliais por campo são consideradas más amostras, pelo que a valorização de crescimento bacteriano perde valor clínico. Posteriormente, com a objetiva de 100x é observada a morfologia da flora bacteriana presente, que é um grande auxílio na distinção de flora normal ou patogênica.

As amostras são semeadas nos meios apropriados ao crescimento da flora normal e ao isolamento de bactérias potencialmente patogênicas. Após incubação em aerobiose, 37°C durante 24 horas, as placas são observadas. De acordo com a informação obtida no Gram, valoriza-se essencialmente o crescimento dos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, e eventualmente outras bactérias de Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. O crescimento de *Streptococcus* spp. normalmente é abundante neste tipo de amostras, uma vez que fazem parte da flora normal da boca, logo não deve ser valorizado. O crescimento de fungos em amostras respiratórias deve ser valorizado caso a qualidade da amostra seja boa e caso o crescimento seja moderado na

placa própria para o crescimento de fungos. Esta deve permanecer em incubação ao longo de três dias com vista a se observar o tipo de crescimento dos fungos.

Pesquisa de micobactérias

Em algumas das amostras que chegam ao laboratório pode também ser requisitada a pesquisa de micobactérias, comumente designada por pesquisa de BK (Bacilo de Koch). As infecções por micobactérias são de elevada relevância em saúde pública, pois a micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose pulmonar. É efetuado um esfregaço para coloração de Ziehl-Neelsen, com o objetivo de observar a presença de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) típicos de micobactérias. Na observação microscópica, os bacilos surgem vermelhos num fundo azul.

O exame cultural permite a identificação da espécie de micobactéria em causa, que não é possível através da observação microscópica. As amostras respiratórias para BK são submetidas a um processo de homogeneização e descontaminação e seguidamente são semeadas em meio sólido, Lowenstein Jensen, enriquecido com ovo, aspargina e fécula que favorece o crescimento de micobactérias, e num meio líquido que se encontra em frascos do sistema Bact/Alert 3D próprios para o efeito. O meio sólido é incubado em estufa a 37°C em aerobiose, e ao fim de 60 dias o resultado é dado como negativo na ausência de crescimento. Caso ocorra crescimento, as colónias são características e adquirem uma cor amarela.

Relativamente aos frascos do sistema Bact/Alert 3D, também são incubados a 37°C no equipamento e monitorizados durante 42 dias. Caso haja crescimento bacteriano, o equipamento deteta um aumento de fluorescência e emite um sinal. Nestes casos, procede-se à observação dos BAAR previamente corados e faz-se uma sementeira diretamente do meio líquido em meio CLED para despistar uma possível contaminação. Caso a amostra esteja contaminada, deverá repetir-se todo o processo de descontaminação e incubação.

No caso de reunidas todas as condições que permitem um resultado positivo para *Mycobacterium tuberculosis* (ou seja, crescimento no meio líquido, no meio sólido e observação dos bacilos ácido-álcool resistentes ao microscópio ótico), a cultura é enviada para o INSA onde é feita a identificação e TSA.

2.16 Esperma

A espermocultura auxilia o diagnóstico de infecções do trato genital masculino. A amostra de esperma deve ser colhida para um recipiente estéril de boca larga e conservada à temperatura ambiente até ser manipulada. É efetuado um exame direto com coloração de Gram, para observação ao microscópio ótico, em que se faz uma quantificação de bactérias existentes. Após a escolha dos meios apropriados, faz-se a sementeira das placas, que devem ser observadas nas 24-48 horas seguintes. Os microrganismos patogênicos mais frequentes são *Neisseria gonorrhoea*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Enterobacteriaceae*.

2.17 Casos clínicos

Caso Clínico I

Uma criança de dois anos dá entrada no serviço de urgência do CHTMAD com fezes diarreicas. É colhida uma amostra de fezes, que no laboratório é semeada nas geloses SS, MacConkey, Yersinia, Campyloset, SMAC e caldo GN. Os meios são incubados na estufa a 37°C, sendo que a gelose de sangue no final do dia é transferida para a estufa que contém uma concentração de dióxido de carbono mais elevada. Cerca de 24 horas depois, é feita a observação das placas.

Na gelose Campyloset não há crescimento, no entanto este meio fica em estufa (atmosfera microaerofílica) durante três dias até o resultado ser negativo. Tanto na gelose Yersinia como na SMAC não há igualmente crescimento bacteriano. No entanto, há crescimento bacteriano na gelose MacConkey e SS. Na primeira, são observadas colónias incolores. Na segunda, observaram-se colónias incolores com centro negro. Entretanto o caldo GN, ao final de um dia, é repicado para MacConkey e para SS, cujo crescimento é igual ao obtido nas placas descritas.

Procedeu-se à repicagem destas colónias para gelose de chocolate (PVX) e para MacConkey, com vista à obtenção de cultura pura. Um dia depois, a partir do crescimento obtido na gelose MacConkey, é efetuado o teste de aglutinação Difco Salmonella O Poly A-I e Vi Antisoro, cujo resultado é positivo. Assim sendo, efetua-se um API 20E, em que durante o tempo de incubação há produção de metabolitos específicos pelas bactérias que são detetados pela alteração da cor. O resultado obtido na leitura é *Salmonella enterica*.

É efetuado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos numa gelose de Mueller Hinton, testando os seguintes antibióticos: ampicilina, amoxicilina + ac. clavulânico, cotrimoxazol, ciprofloxacina. O resultado é sensível para todos os antibióticos.

Caso clínico 2

Um homem de 28 anos dá entrada no serviço de urgência do CHTMAD com garganta inflamada e febre. É colhida uma zaragatoa da zona da orofaringe e semeada em gelose de sangue e inoculada no caldo Todd Hewitt.

Após 24 horas de incubação, faz-se a leitura das placas. Observam-se colónias translúcidas, pequenas, com superfície lisa e β -hemolíticas na gelose de sangue. O caldo Todd Hewitt apresenta um aspeto turvo após as 24 horas, pelo que é repicado para gelose de sangue para confirmação. É efetuado o teste da catalase, que dá negativo.

A observação ao microscópio do esfregaço obtido da zaragatoa após coloração de Gram é importante, uma vez que se observam cocos de Gram positivo em cadeia, sugestivos de estreptococos.

É efetuada a identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos em simultâneo no aparelho MicroScan WalkAway 96 plus, cujo resultado obtido é *Streptococcus pyogenes*, o agente etiológico bacteriano associado a faringites. São validados os seguintes antibióticos para o paciente: penicilina, ampicilina, amoxicilina + ác. clavulânico, cefotaxima, levofloxacina, cotrimoxazol.

Caso clínico 3

Um homem com 69 anos dá entrada no serviço de urgência do CHTMAD com febre e alterações mentais. É colhida uma amostra de urina para urocultura, cujo resultado é negativo, uma amostra de expectoração, cujo resultado é dado como flora normal, e é colhido sangue para hemocultura.

No dia seguinte o aparelho Bact/Alert 3D dá as quatro garrafas de hemocultura do paciente como positivas, tanto as anaeróbias como as aeróbias. Cada uma é repicada para gelose de sangue, MacConkey e gelose MRSA ChromID, incubadas em estufa a 37°C. A gelose de sangue no final do dia é transferida para a estufa que contém uma concentração de dióxido de carbono mais elevada. Cerca de 24 horas depois, observam-se as placas.

A gelose MacConkey não apresenta crescimento bacteriano. A gelose de sangue apresenta colónias grandes, amareladas e com β -hemólise. A gelose MRSA ChromID apresenta colónias verdes, características de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

É efetuada a identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos em simultâneo no aparelho MicroScan WalkAway 96 plus, cujo resultado obtido é *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. São validados os seguintes antibióticos para o paciente: vancomicina, daptomicina, teicoplanina, linezolid (são naturalmente resistente aos β -lactâmicos, cefalosporinas, carbapenemes). Uma vez que o doente continua internado no hospital, são sugeridas medidas de isolamento.

Caso clínico 4

Uma mulher com 77 anos dá entrada no serviço de urgência do CHTMAD com febre alta, tosse com secreção de muco e dor torácica. É colhida uma amostra de expetoração e semeada no laboratório numa gelose MacConkey, MRSA ChromID, Candida ChromID, gelose de sangue e gelose chocolate Haemophilus. As geloses são incubadas em estufa a 37°C, sendo que a gelose de sangue no final do dia é transferida para a estufa que contém uma concentração de dióxido de carbono mais elevada. A gelose Candida ChromID é colocada numa estufa específica para o crescimento de fungos. É efetuado também um esfregaço a partir da expetoração para coloração de Gram.

A observação do esfregaço ao microscópio ótico permite concluir acerca da boa qualidade da amostra, uma vez que se fez uma contagem superior a 25 neutrófilos por campo e inferior a 10 células epiteliais por campo. Isto permite prosseguir com o estudo de forma mais fiável. Além da avaliação da qualidade da amostra, observa-se a flora bacteriana existente e se há algum predomínio. Neste caso, o predomínio eram cocos Gram positivo em cadeia, sugestivos de estreptococos.

No dia seguinte, observam-se as placas. Tanto na gelose MacConkey, na gelose MRSA ChromID e na Candida ChromID não é observado crescimento. Na gelose chocolate Haemophilus o crescimento bacteriano não é valorizável, uma vez que exclui qualquer espécie de *Haemophilus*. Na gelose de sangue o predomínio é de colónias lisas, pequenas, com uma zona de depressão central e com α -hemólise (halo esverdeado). Estas colónias são repicadas para gelose de sangue com disco de optoquina, que no dia seguinte se observa que é sensível.

É efetuada a identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos em simultâneo no aparelho MicroScan WalkAway 96 plus, cujo resultado obtido é *Streptococcus pneumoniae*. São validados os seguintes antibióticos para o paciente: amoxicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cefotaxima, levofloxacina e cotrimoxazol.

Conclusão

O estágio curricular é fundamental para qualquer estudante dar início à sua vida profissional. No âmbito das análises clínicas, este permite por em prática e aprofundar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do mestrado, no sentido de se ter a perceção da importância do pedido de cada análise e de se saber interpretar os resultados obtidos.

O estágio permitiu perceber e acompanhar a rotina de um analista clínico ao longo do dia e perceber a importância de um controlo rigoroso em cada uma das fases analíticas, uma vez que um erro em qualquer uma pode ser crucial no resultado final. Além disto, foi importante para entender como funciona a política da qualidade num laboratório de análises clínicas, através do controlo de qualidade interno e externo, e saber como agir numa situação fora do esperado. O espírito crítico revelou-se fundamental na análise do resultado final, que deve ter sido em conta o contexto do doente e a sua história clínica.

O facto de o estágio ter sido realizado num laboratório privado e num público, dois locais bem distintos, foi uma mais valia pois permitiu adquirir mais contacto e experiência no manuseamento das amostras e dos aparelhos, permitiu uma melhor perceção dos diferentes tipos de doentes e análises associadas a cada, e permitiu também uma melhor perceção da gestão de custos.

Por fim, resta agradecer a toda a equipa do LAC Dr. Ferraz Alves e do Serviço de Patologia Clínica do CHTMAD pela excelente receção, integração e transmissão de conhecimentos, que permitiram aumentar o interesse e a vocação pela área das Análises Clínicas.

Bibliografia

1. DA RIN, G. Pre-analytical workstations: A tool for reducing laboratory errors. *Clinica Chimica Acta*. 2009; 404(1): 68-74.
2. Manual das Boas Práticas Laboratoriais. Despacho nº 8835/2001 (2ª. Série).
3. BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David. E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6ª edição. Missouri: Saunders Elsevier, 2008.
4. JOHNSON, D. W. Global Proteinuria Guidelines: Are We Nearly There Yet? *Clin Biochem Ver*. 2011; Vol 32: 89-95.
5. EVANS, T. W. Review article: albumin as a drug – biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002; 16 (Suppl. 5): 6-11.
6. KO, A. R., et al. High-Sensitivity C-Reactive Protein Can Reflect Small Airway Obstruction in Childhood Asthma. *Yonsei Medical Journal*. 2016; 57 (3): 690-697.
7. SCHROEDER, H. W., et al. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125 (202): 41-52.
8. VAVRICKA, S. et al. Serum Protein Electrophoresis: Na Underused but Very Useful Test. *Digestion*. 2009; 79: 203-210.
9. NORDQVIST, C. What is blood sugar? What is blood glucose? *Medical News Today*. 2014.
10. Diagnóstico e Classificação da Diabetes *Mellitus*. Norma da Direção Geral da Saúde 002/2011.
11. SUMITA, N. et al. Importância da hemoglobina glicada no controlo do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crónicas. *J Bras Patol Med Lab*. 2008; 44(3): 169-174.

12. Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c. Norma da Direção Geral da Saúde 033/2011.
13. FEINGOLD, K. et al. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext. 2015 [Acedido a 16 de abril 2016]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
14. PARTHASATHY, S. et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein. Methods Mol Biol. 2010; 610: 403-417.
15. SODRE, F. et al. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2007; 43(5).
16. MARTIN, L. et al. Uric acid – Blood. Medline Plus Medical Encyclopedia. 2015 [Acedido a 28 de abril 2016]. Disponível na Internet:
<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003476.htm>
17. Urine Albumin and Albumin/Creatinine Ratio. Lab Tests Online. 2015 [Acedido a 2 de maio 2016]. Disponível na Internet:
<https://labtestsonline.org/understanding/analytes/microalbumin/tab/sample/>
18. Diagnóstico Sistemático da Nefropatia Diabética. Norma da Direção Geral da Saúde 008/2011.
19. LIMDI, J. et al. Evaluation of abnormal liver function tests. Postgrad Med. 2003; 79: 307-312.
20. MILLAN J. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. Purinergic Signalling. 2006; 2: 335.
21. MARTINELLI, A. Icterícia. Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto. 2004; 37: 246-252.

22. The Pancreas Center: Pancreatic Cancer Diagnosis, Prevention and Treatment. Columbia University, Department of Surgery. [Acedido a 8 de maio 2016]. Disponível na Internet: <http://columbiasurgery.org/pancreas>
23. ABBASPOUR, N. et al. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2014; 19(2): 164-174.
24. LINDA, J. et al. LDH isoenzyme blood test. *MedlinePlus Medical Encyclopedia* [Acedido a 10 de maio 2016]. Disponível na Internet: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003499.htm>
25. Calcium. University of Maryland Medical Center. 2015 [Acedido a 10 de maio 2016]. Disponível na Internet: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/calcium>
26. Magnesium. University of Maryland Medical Center. 2015 [Acedido a 10 de maio 2016]. Disponível na Internet: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/magnesium>
27. CHEN, M. et al. Sodium in diet. *MedlinePlus Medical Encyclopedia* [Acedido a 10 de maio 2016]. Disponível na Internet: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002415.htm>
28. Potassium. University of Maryland Medical Center. 2015 [Acedido a 10 de maio 2016]. Disponível na Internet: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/potassium>
29. WAX, E. et al. Chloride in diet. *MedlinePlus* [Acedido a 10 de maio 2016]. Disponível na Internet: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002417.htm>
30. ISENBERG, H. D. *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Press. 1998.
31. TORTORA, G., et al. *Microbiologia*. Artmed. 10ª edição, 2012.
32. COSTA, P., et al. Hemoculturas. *Revista de Saúde Amato Lusitano*. 2013; 32: 25-30.

33. BEITUNE, P. et al. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005; 9(3): 276-282.

34. ROCHA, M. et al. O *Clostridium difficile* como agente indutor de diarreia inflamatória. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999; 32(1): 47-52.