



Daniela Santos Conde Costa

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Mestre e especialista em Análises Clínicas Dr<sup>a</sup> Carla Cruz e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Santos Conde Costa

# **Relatório de Estágio**

## **Mestrado em Análises Clínicas**

Estágio realizado no Laboratório Aeminium, Lda. em Coimbra, orientado pela Mestre e especialista em Análises Clínicas Dr<sup>a</sup> Carla Cruz, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho, 2016



Universidade de Coimbra



## **Agradecimentos**

Agradeço à Dr.<sup>a</sup> Carla Cruz, à Dr.<sup>a</sup> Alda Campos e ao Dr. Dário Costa por me terem aceite para a realização deste estágio no seu Laboratório e por toda a disponibilidade, conhecimento e orientação que demonstraram ao longo destes 7 meses.

Agradeço à Professora Dr.<sup>a</sup> Leonor Almeida por todo o apoio e orientação ao longo destes dois anos de mestrado.

Agradeço à Professora Dr.<sup>a</sup> Sara Domingues pelo apoio, ajuda e colaboração na execução e melhoria do relatório.

Agradeço a todos os elementos da equipa técnica pelo ótimo acolhimento, todo o apoio que demonstraram e conhecimento que transmitiram.

Agradeço à Melanie Santos, Sofia Areias, Sílvia Pinto por toda a disponibilidade que tiveram comigo para eu poder aprender.

Aos meus pais agradeço a educação, os ideais e os valores que me transmitiram e que me fazem ser a pessoa que sou hoje em dia. Agradeço ainda a confiança que depositaram e todos os esforços que fizeram para que terminasse o meu percurso académico.

Agradeço aos meus avós por toda a preocupação, força e motivação que me deram em todos os momentos da minha vida.

Agradeço ao meu namorado por todo o apoio, companheirismo e confiança que tem disposto ao longo destes últimos 6 anos.

Agradeço aos meus colegas de casa toda a amizade e todos os bons momentos que me proporcionaram ao longo de 5 anos sempre juntas.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos e colegas que se cruzaram comigo neste percurso e me apoiaram.



# Índice

<b>Índice</b> .....	V
<b>Índice de Figuras</b> .....	IX
<b>Índice de Tabelas</b> .....	XI
<b>Abreviaturas</b> .....	XIII
<b>Resumo</b> .....	XV
<b>Abstract</b> .....	XVI
<b>Introdução</b> .....	I
<b>Caracterização do Laboratório</b> .....	3
1. Descrição do Laboratório.....	3
2. Fluxo de Amostras.....	4
<b>Sector da Imunologia</b> .....	5
1. Princípios dos Imunoensaios.....	5
1.1. Cobas e601 Analyser® da Roche Diagnostic™ .....	5
1.1.1. Técnica de Sandwich.....	5
1.1.2. Imunoensaio competitivo.....	6
1.1.3. Ensaio Imunoturbidimétrico.....	7
1.2. miniVidas® bioMérieux™ .....	7
1.2.1. Técnica de <i>Sandwich</i> .....	7
1.2.2. Método imunoenzimático por imunocaptura.....	8
2. Marcadores Tumorais .....	9
2.1. Alfa-Fetoproteína (AFP) .....	10
2.2. Antígeno Carcino-Embrionário (CEA).....	10
2.3. Antígeno Carbohidrato 19.9 (CA 19.9).....	11
2.4. Antígeno Carbohidrato 125 (CA125) .....	11
2.5. Antígeno Específico da Próstata (PSA).....	12
2.6. Tiroglobulina (Tg) .....	13

2.7.	$\beta_2$ – Microglobulina ( $\beta$ -2 M) .....	13
3.	Endocrinologia .....	15
3.1.	Função Tiroideia .....	15
3.1.1.	Hormona Estimulante da Tiroide (TSH).....	15
3.1.2.	Tiroxina Livre (FT4) e Tiroxina (T4) .....	15
3.1.3.	Triiodotironina Livre (FT3) e Triiodotironina Total (T3).....	16
3.1.4.	Anti-Tiroperoxidase .....	17
3.1.5.	Anti-Tiroglobulina .....	18
3.2.	Função Gonadal/Hormonas Sexuais.....	18
3.2.1.	Hormona Luteinizante (LH).....	18
3.2.2.	Hormona Folículo-Estimulante (FSH).....	19
3.2.3.	$17\beta$ – Estradiol.....	20
3.2.4.	Progesterona .....	21
3.2.5.	Testosterona .....	22
3.2.6.	Dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-s) .....	22
3.2.7.	Gonadotrofina coriônica humana ( $\beta$ -hCG) .....	23
3.2.8.	Prolactina (PRL) .....	24
3.3.	Homeostase do Cálcio .....	25
3.3.1.	Hormona da Paratiroide (PTH) .....	25
3.3.2.	25-Dihidroxitamina D .....	26
4.	Virologia.....	28
4.1.	Hepatites.....	28
4.1.1.	Vírus da Hepatite A .....	28
4.1.2.	Vírus da Hepatite B (HBV).....	30
4.1.3.	Vírus da Hepatite C (HCV).....	31
4.2.	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) .....	33
4.3.	Citomegalovírus (CMV) .....	34
5.	Infeções Parasitárias .....	35
5.1.	Toxoplasmose .....	35
6.	Gestão e Garantia da Qualidade .....	37
6.1.	Controlo da Qualidade Interno .....	37

6.2. Controlo Externo da Qualidade.....	38
<b>Setor da Microbiologia.....</b>	<b>39</b>
1. Amostras.....	39
1.1. Urina.....	39
1.2. Sangue.....	40
1.3. Fezes.....	42
1.4. Exsudados.....	44
1.4.1. Vaginal/Uretral.....	44
1.4.2. Pús.....	46
1.4.3. Faríngeo.....	47
1.4.4. Ocular.....	48
1.5. Expetoração.....	49
1.6. Esperma.....	50
2. Provas de Identificação.....	51
2.1. Técnica de Coloração de Gram.....	51
2.2. Teste da Catalase.....	52
2.3. Teste da Oxidase.....	52
2.4. Teste da Urease.....	52
2.5. Teste da Coagulase (Pastorex™ STAPH-plus).....	53
2.6. Teste de Identificação dos Grupos de Lancefield em Streptococcus spp. (PathoDXTRA Strep Grouping KIT).....	54
2.7. Caldo Granada difásico.....	54
2.8. Cartas de Identificação para Vitek® 2 Compact.....	55
3. Provas de Suscetibilidade aos Antimicrobianos.....	56
4. Controlo da Qualidade.....	58
<b>Conclusão.....</b>	<b>59</b>
<b>Referências.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexos</b>	





## Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da técnica de Sandwich utilizada pelo equipamento Cobas e601 Analyser® da Roche Diagnostic™. ....	6
Figura 2 – Representação esquemática do método competitivo utilizado pelo equipamento Cobas e601 Analyser® da Roche Diagnostic™. ....	6
Figura 3 – Princípio imunoenzimático utilizado pelo equipamento miniVidas®. ....	8
Figura 4 – Diagrama de alguns marcadores tumorais mais frequentemente encontrados nos tumores dos vários órgãos. ....	9
Figura 5 – Relação entre as concentrações de PSA total e o rácio PSA livre:PSA total e a probabilidade de desenvolver cancro da próstata. ....	12
Figura 6 – Relação entre a TSH e FT4. Tireoide e Hipófise como um termóstato que regulam os níveis hormonais. ....	16
Figura 7 – Fontes metabólicas da T3 e T4. ....	16
Figura 8 – Algoritmo para avaliação laboratorial da função da tireoide. ....	17
Figura 9 – Alterações ováricas e hormonais durante um ciclo menstrual normal. ....	19
Figura 10 – Variação dos níveis de $\beta$ -hCG durante a gestação. ....	24
Figura 11 – Homeostase do Cálcio plasmático. Mecanismo de feedback negativo que promovem o retorno do cálcio aos níveis normais sem aumento simultâneo do fosfato plasmático acima do normal. ....	26
Figura 12 – Linha temporal das manifestações do Vírus da Hepatite A. ....	29
Figura 13 – Algoritmo para o diagnóstico da Hepatite A. ....	29
Figura 14 – Estrutura do vírus da Hepatite B. ....	30
Figura 15 – (A) Curso serológico típico de uma hepatite B aguda com cura. (B) Curso serológico típico de uma hepatite B aguda com progressão para Hepatite B crónica. ....	31
Figura 16 – (A) Curso serológico dos marcadores durante uma infeção aguda por HCV. (B) Curso serológico durante uma infeção crónica por HCV. ....	32
Figura 17 – Curso serológico da infeção por vírus da Imunodeficiência Humana. ....	34
Figura 18 – (A) Urocultura em CLED negativa; (B) Urocultura em CLED negativa; (C) Urocultura em CLED positiva. ....	40
Figura 19 – (A) Hemocultura negativa; (B) Hemocultura positiva. ....	41
Figura 20 – (A) Exame microscópico onde se podem observar bacilos Gram-negativos curvos. (B) Meio seletivo onde se podem ver colónias cinzentas sugestivas de <i>Campylobacter spp.</i> ....	42

Figura 21 – (A) Colónias de <i>Shigella spp.</i> em Hektoen. (B) Colónias de <i>Salmonella spp.</i> em Hektoen. (C) Colónias de <i>Escherichia coli</i> em Hektoen.....	43
Figura 22 – (A) <i>Trichomonas vaginalis</i> após coloração pela técnica de <i>May-Grunwald Giemsa</i> . (B) <i>Clue cells</i> características de <i>Gardnerella vaginalis</i> no exame direto. (C) Leveduras características de <i>Candida albicans</i> após coloração de Gram. (D) Colónias de leveduras no meio Sabouraud.....	45
Figura 23 – (A) Exame direto de um exsudado faríngeo onde se pode observar uma flora abundante. (B) Exame cultural em meio COS onde se pode ver a hemólise completa do meio em torno das colónias característica de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	48
Figura 24 – (A) Ausência de leucócitos mas elevada de presença de bactérias contaminantes e células epiteliais. A amostra em questão não é uma expetoração, é saliva. (B) Expetoração aceitável para cultura onde há a presença de leucócitos e diplococos Gram-positivos. ....	49
Figura 25 – Procedimento da coloração de Gram onde pode ser observado que bactérias Gram-positivas ficam coradas de roxo e bactérias Gram-negativo ficam coradas de rosa.....	51
Figura 26 – A reação da esquerda representa uma reação positiva onde se pode observar a formação de agregados. Na reação da direita, a suspensão não apresenta agregados, pelo que é negativa.....	53
Figura 27 – Diferenças entre estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> altamente capsuladas que impedem a aglutinação e é dado um resultado falso-negativo e estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> pouco capsuladas. ....	54
Figura 28 – Conjunto de resultados após 18 horas de incubação, onde o aparecimento de coloração laranja-vermelho é considerado positivo. A ausência de pigmentação laranja é considerada um teste negativo.....	55
Figura 29 – Procedimento para a Identificação e Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos utilizado para o equipamento Vitek® 2 Compact.....	56

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Equipamentos do Laboratório Aeminium, Lda.....	4
Tabela 2 – Valores de referência da LH e FSH encontrados em diferentes fases do ciclo menstrual, em situações de pós-menopausa e nos homens. ....	18
Tabela 3 – Valores de referência da Progesterona e do $17\beta$ - Estradiol encontrados em diferentes fases do ciclo menstrual, em situações de pós-menopausa e no 1º Trimestre de gravidez. ....	21
Tabela 4 – Valores de referência da Testosterona encontrados em mulheres e homens. ....	22
Tabela 5 – Sumário dos possíveis resultados no diagnóstico de infecção por CMV.....	35
Tabela 6 – Microrganismos mais comumente encontrados em infecções da pele. ....	46
Tabela 7 – Microrganismos patogénicos mais comuns em infecções do trato respiratório inferior consoante as idades.....	50
Tabela 8 – Carta de Identificação e Antibiograma usados para determinados microrganismos. ....	57



## Abreviaturas

17 $\beta$ -E – 17 $\beta$ -Estradiol

AFP – Alfa-Fetoproteína

ALT – Alanina Aminotransferase

A-Tg – Anti-Tiroglobulina

A-TPO – Anti-Tiroperoxidase

$\beta$ 2-M –  $\beta$ 2-microglobulina

$\beta$ -hCG – Gonadotrofina Coriônica humana, do inglês *Human Corionic Gonadotrofin*

CA19.9 – Antígeno Carbohidrato 19.9, do inglês *Cancer Antigen 19.9*

CA125 – Antígeno Carbohidrato 125, do inglês *Cancer Antigen 125*

CEA – Antígeno Carcino-Embrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*

CLED – Cistina, Lactose, Défice em Eletrólitos

COS – Ágar Columbia + 5% Sangue de Ovelha

DHEA-s – Dehidroepiandrosterona-Sulfato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

FSH – Hormona Folículo Estimulante, do inglês *Follicle-stimulating Hormone*

FT3 – Triiodotironina livre, do inglês *Free Triiodothyronine*

FT4 – Tiroxina livre, do inglês *Free Thyroxine*

HAV – Vírus da Hepatite A, do inglês *Hepatitis A Virus*

HBV – Vírus da Hepatite B, do inglês *Hepatitis B Virus*

HCV – Vírus da Hepatite C, do inglês *Hepatitis C Virus*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LH – Hormona Luteinizante, do inglês *Luteinizing Hormone*

PRL – Prolactina

PSA – Antígeno Específico da Próstata, do inglês *Prostate-Specific Antigen*

PTH – Hormona da Paratiroide, do inglês *Parathyroid Hormone*

PVX – Ágar Chocolate PolyViteX

RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*

T3 – Triiodotironina Total

T4 – Tiroxina Total

Tg – Tiroglobulina

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSH – Hormona Estimulante da Tiroide, do inglês *Thyroid-Stimulating Hormone*

VCAT – Agar Seletivo de Vancomicina, Colistina sulfato, Anfotericina B e Trimetoprim

## Resumo

O presente relatório tem por objetivo descrever e consolidar as atividades realizadas no decorrer do estágio no Laboratório Aeminium, Lda. no período de 1 de dezembro de 2015 a 30 de junho de 2016.

Mais do que uma descrição das atividades clínicas desenvolvidas durante o estágio, o relatório mostra, na globalidade, a rotina do laboratório, as metodologias e parâmetros determinados, e ainda o controlo de qualidade inerente à prática laboratorial. É importante referir que a área das Análises Clínicas tem um grande relevo no diagnóstico médico e revela-se uma ferramenta fundamental como exame complementar de diagnóstico.

É através das análises que conseguimos fazer a interpretação de casos clínicos que aparecem diariamente no laboratório, de forma a alcançar um diagnóstico diferencial e ter espírito crítico no tratamento e interpretação das amostras e dos seus resultados.

Neste relatório são destacadas as áreas de Imunologia e Microbiologia, não só pela sua importância no Laboratório de Análises Clínicas, mas também porque fazem parte das minhas preferências pessoais.



## **Abstract**

The present work aims to describe and consolidate the activities developed as part of my internship at Laboratório Aeminium Lda from the 1<sup>st</sup> of December 2015 to the 30<sup>th</sup> of June 2016.

More than a description of the clinical activities carried out during the internship, the report shows, in general, the laboratory routine, the methods used and determined parameters, as well as the quality control process, inherent to laboratory practice. It is important to state that the Clinical Analysis field is of great importance to the medical diagnosis and an essential complementary mean of diagnosis.

It is through the analysis that we can interpret clinical cases that appear daily in the laboratory, in order to achieve a differential diagnosis and to have a critical spirit in processing and interpreting samples and their results.

In this report, the Immunology and Microbiology fields are highlighted, not only for its importance in the Clinical Analysis Laboratory, but also because they represent some of my personal preferences.

## Introdução

O Mestrado em Análises Clínicas culmina com a realização de um Estágio Curricular que é de extrema importância para o futuro de um Analista Clínico, pois não só nos permite interligar todos os conhecimentos adquiridos lecionados, bem como nos integra no dia-a-dia de um Laboratório de Patologia Clínica.

O profissional de Análises Clínicas integra uma equipa multidisciplinar que tem como funções o prognóstico, o diagnóstico e o auxílio terapêutico da doença. As Análises Clínicas são assim imprescindíveis para os exames clínicos, pelo que os resultados devem ser rigorosos e interpretados em função da técnica utilizada, sensibilidade e especificidade.

As Análises Clínicas são um dos meios complementares de diagnóstico mais importantes que se encontram à disposição dos médicos. Estas podem dividir-se em quatro grandes valências, Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia, as quais tive a oportunidade de contactar durante o estágio. Contudo, neste relatório vou desenvolver apenas a Imunologia e Microbiologia.

Apesar de apenas desenvolver as áreas de Imunologia e Microbiologia tive também oportunidade de efetuar procedimentos nas outras valências. Na Hematologia tive oportunidade de efetuar testes como hemogramas, velocidade de sedimentação, provas de coagulação, hemoglobina A1c, esfregaços de sangue periférico incluindo a sua respetiva coloração e visualização ao microscópio e contagem de reticulócitos. Também na área da Bioquímica tive oportunidade de efetuar análises diversas e que fazem parte das análises de rotina prescritas pelos médicos, por exemplo Glicose, Colesterol Total, HDL e LDL, Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase, Fosfatase Alcalina, Gama Glutamil-Transferase, Creatinina, Ureia, Ácido Úrico, Lipase, Amilase, Proteína C Reativa e Fator Reumatoide. Em todas as valências tive contato com os respetivos controlos de qualidade internos, avaliando com espírito crítico todos os resultados.

O meu estágio foi realizado no Laboratório Aeminium Lda. que está equipado técnica, científica e humanamente para responder às necessidades dos utentes, onde se podem realizar um vasto número de análises, desde análises de rotina a análises mais específicas, atendendo a critérios rigorosos de qualidade. O estágio decorreu desde 1 de dezembro de 2015 a 30 de junho de 2016, período no qual tive a oportunidade de integrar as diferentes valências.



# Caracterização do Laboratório

## I. Descrição do Laboratório

O Laboratório Aeminium é o mais antigo Laboratório de Análises Clínicas da Cidade de Coimbra, exercendo atividade desde 2 de janeiro de 1956. Teve como seu fundador e Diretor Técnico o Professor Doutor Henrique de Oliveira, Professor Catedrático e Diretor do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Em 1996, o Laboratório foi adquirido pelo Grupo MediServiços que avançou com processos de modernização, mudança de instalações e ainda a informatização do Sistema de Gestão de Análises. Desde então o Laboratório tem vindo a crescer com a abertura de novos postos de colheitas e com a implementação de novos acordos de prestação de serviços.

Com a Licença de Funcionamento nº5/2007, foi atribuída Certificação de Qualidade em 2003, segundo a norma NP EN ISO 9001:2000 como resultado de uma prestação de serviços de elevada qualidade e eficácia de modo a garantir um elevado grau de satisfação por parte dos médicos e utentes.

Para além dos muitos postos de colheitas localizados um pouco por toda a região Centro de Portugal, há ainda duas clínicas de diálise, algumas clínicas privadas e colheitas de medicinas de trabalho que também enviam amostras para o laboratório, perfazendo uma média diária de 250 utentes.

De modo a satisfazer todos os requisitos, o Laboratório Aeminium conta com profissionais especializados, como por exemplo Técnicos de Análises Clínicas, Farmacêuticos Especialistas em Análises Clínicas e um Médico Patologista, que diariamente cumprem criteriosamente todos os pedidos.

O Laboratório subdivide-se em diferentes sectores ainda que funcionem interligados. Os diferentes sectores são: Química Clínica, Hematologia, Microbiologia, Imunologia, Endocrinologia, Serologia e Virologia. De maneira a dar uma resposta eficaz e o mais célere possível, o Laboratório está dotado de equipamentos com tecnologia de ponta.

Na tabela I, estão indicados os equipamentos que integram o Laboratório.

**Tabela I** – Equipamentos do Laboratório Aeminium, Lda.

<b>Área</b>	<b>Equipamento</b>
<i>Bioquímica</i>	Urisys 2400 <sup>®</sup> da Roche Diagnostic <sup>™</sup>
	Cobas c501 Analyser <sup>®</sup> da Roche Diagnostic <sup>™</sup>
	G8 HPLC Analyzer <sup>®</sup> da Tosoh Bioscience
<i>Microbiologia</i>	Vitek <sup>®</sup> 2 da bioMérieux <sup>™</sup>
	Mini API <sup>®</sup> bioMérieux <sup>™</sup>
<i>Hematologia</i>	ABX Pentra DX-DF da Horiba <sup>®</sup>
	Test I THL da ALI FAX <sup>®</sup>
	STA Compact da Diagnostica Stago <sup>®</sup>
<i>Imunologia, Serologia, Endocrinologia e Virologia</i>	Cobas e601 Analyser <sup>®</sup> da Roche Diagnostic <sup>™</sup>
	Hydrasis <sup>®</sup> da Sebia <sup>™</sup>
	miniVidas <sup>®</sup> bioMérieux <sup>™</sup>

## 2. Fluxo de Amostras

O primeiro contato do utente com o Laboratório dá-se na receção, local onde é feito o registo informático com os dados do utente bem como as análises pedidas. A cada processo são atribuídos um número e um conjunto de três letras que diferem consoante o posto de colheita onde o utente se dirigiu. Posteriormente ao registo informático e à colheita, todas as amostras são transportadas para o laboratório central, sendo recebidas primeiramente na zona de triagem onde de seguida são distribuídas pelas diferentes áreas. Cada amostra tem um código de barras, de forma a poderem ser automaticamente processadas pelos equipamentos. Após o processamento, os resultados são gravados no sistema informático pelos técnicos que verificam a conformidade dos resultados, isto é, fazem a validação técnica. Quando todas as análises de um processo estão realizadas, o Diretor Técnico valida o conjunto dos resultados verificando a coerência dos resultados entre si, isto é, fazem a validação biopatológica, emitindo no final um boletim que é depois impresso e entregue ao utente.

## Sector da Imunologia

A interpretação de exames laboratoriais é uma atividade de extrema importância na atividade clínica, já que a correta avaliação dos exames laboratoriais auxilia no reconhecimento de disfunções.

A imunologia clínica é o estudo de patologias causadas por distúrbios do sistema imunológico, que protege o organismo de doenças. Ainda que o sistema imune seja muito complexo, certos componentes que o integram são facilmente detetados, como por exemplo, os anticorpos. Também pode ser incluída nesta área a Endocrinologia que deteta hormonas que vão ser responsáveis por regular diversos processos do corpo humano, como o crescimento, reprodução e o sono, que necessitam, contudo, de estar em harmonia para exercer as corretas funções.

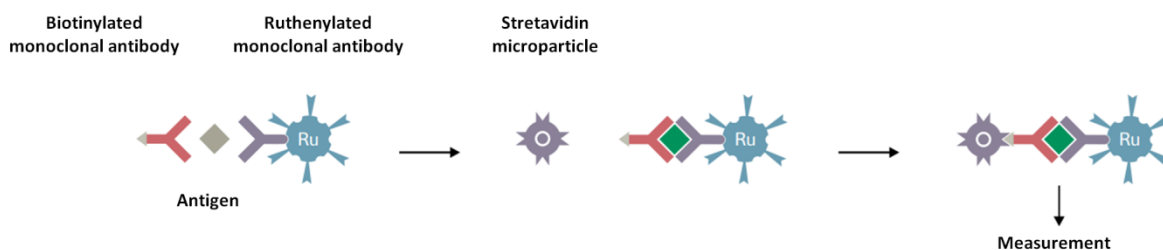
### I. Princípios dos Imunoensaios

#### **I.1. Cobas e601 Analyser® da Roche Diagnostic™**

##### **I.1.1. Técnica de Sandwich**

A técnica de *Sandwich* tem na sua metodologia o uso de dois anticorpos que se vão ligar a dois locais diferentes de um antígeno ou ligando. É adicionado anticorpo biotinilado que é altamente específico para o antígeno presente na amostra clínica. De seguida é adicionada amostra que contém o antígeno e posteriormente o anticorpo secundário marcado com um complexo de ruténio que se irá ligar a um diferente local do primeiro anticorpo (Cox, 2011). Forma-se deste modo um complexo Anticorpo-Antígeno-Anticorpo.

Posteriormente são adicionadas micropartículas revestidas de estreptavidina que promovem a ligação do complexo à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina (Figura 1). A mistura da reação é então aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Por fim é aplicada uma corrente elétrica ao eletrodo onde as micropartículas estão fixadas que induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

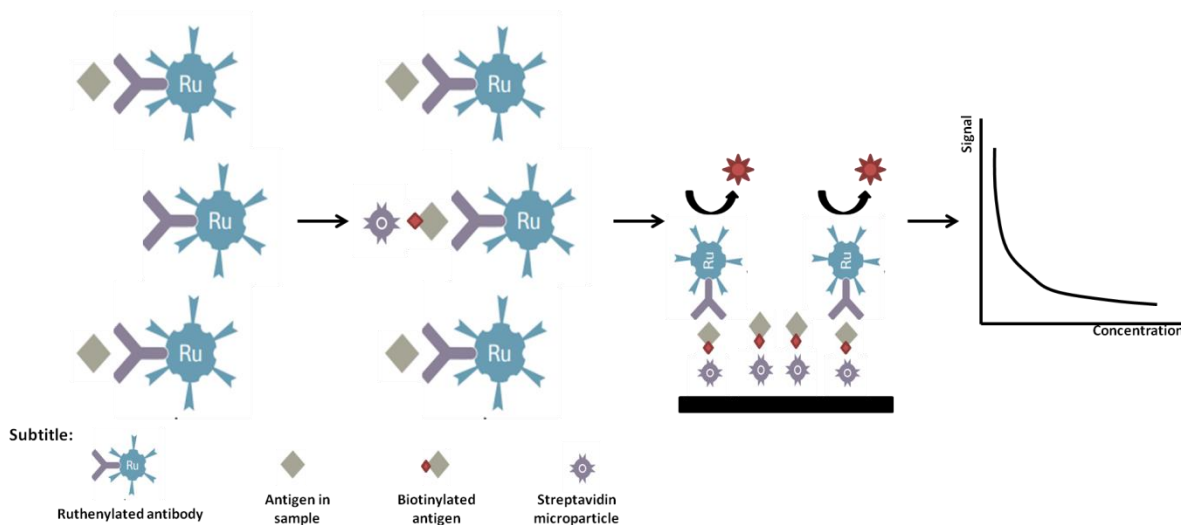


**Figura 1** – Representação esquemática da técnica de Sandwich utilizada pelo equipamento Cobas e601 Analyser® da Roche Diagnostic™. Adaptado de [http://www.cobas.com/content/dam/cobas\\_com/pdf/product/Elecsys%20Calcitonin/Elecsys%20Calcitonin%20Fact%20Sheet.pdf](http://www.cobas.com/content/dam/cobas_com/pdf/product/Elecsys%20Calcitonin/Elecsys%20Calcitonin%20Fact%20Sheet.pdf).

O Antígeno Carbohidrato 125 (CA125), o Antígeno Carbohidrato 19.9 (CA 19.9), o Antígeno Específico da Próstata (PSA) e a Hormona Estimulante da Tireoide (TSH) são alguns exemplos de testes que são doseados recorrendo a esta técnica.

### 1.1.2. Imunoensaio competitivo

No método competitivo, na mesma reação é adicionada a amostra, que pode ou não ter os antígenos, e um derivado do antígeno marcado com biotina; estes dois competem pela ligação ao anticorpo específico marcado com um complexo de rutênio. Após a incorporação das micropartículas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina. Da mesma forma que a técnica de Sandwich, a aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente. Neste caso, o sinal obtido é inversamente proporcional à concentração do analito (Figura 2).



**Figura 2** – Representação esquemática do método competitivo utilizado pelo equipamento Cobas e601 Analyser® da Roche Diagnostic™. Adaptada de [http://www.cobas.com/content/dam/cobas\\_com/pdf/product/Elecsys%20Calcitonin/Elecsys%20Calcitonin%20Fact%20Sheet.pdf](http://www.cobas.com/content/dam/cobas_com/pdf/product/Elecsys%20Calcitonin/Elecsys%20Calcitonin%20Fact%20Sheet.pdf).

O doseamento dos anticorpos Anti-Tiroperoxidase (A-TPO), anticorpos Anti-Tiroglobulina (A-Tg), Triiodotironina Livre (FT3), Tiroxina Livre (FT4) são alguns exemplos de testes determinados recorrendo a um Imunoensaio por competição.

### 1.1.3. Ensaio Imunoturbidimétrico

No ensaio turbidimétrico são adicionados anticorpos específicos ligados ao látex que reagem com o antigénio da amostra e formam complexos antigénio/anticorpo. Estes, após a aglutinação, são determinados por turbidimetria.

A  $\beta$ 2- Microglobulina é um exemplo de um doseamento determinado por imunoturbidimetria.

## 1.2. miniVidas® bioMérieux™

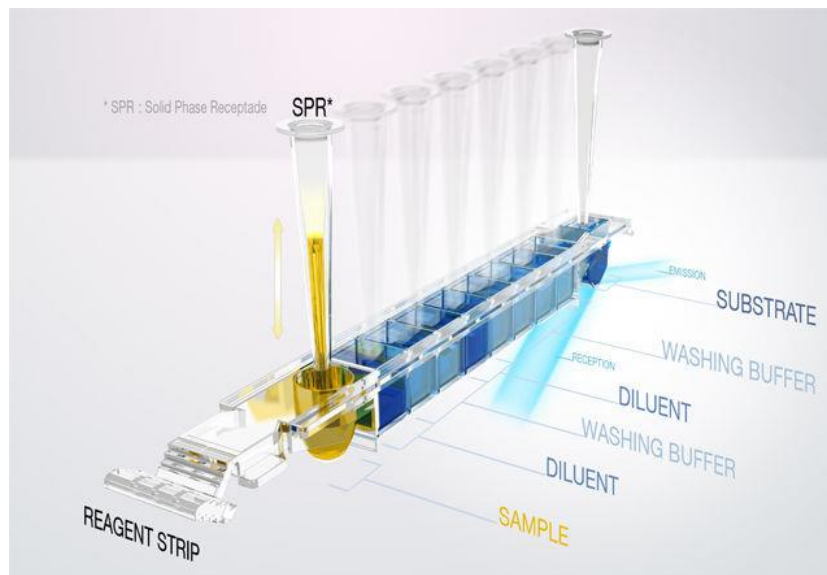
### 1.2.1. Técnica de *Sandwich*

Tal como no equipamento anterior, neste caso o princípio do doseamento também associa o método imunoenzimático sandwich em duas etapas com uma deteção final em fluorescência. O cone serve tanto de fase sólida como de sistema de pipetagem. Os outros reagentes da reação imunológica estão prontos a ser utilizados e pré-repartidos na barrete. Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente no equipamento.

Numa primeira fase a amostra é diluída, depois aspirada e dispensada no interior do cone. Os anticorpos presentes na amostra (se for o caso), vão fixar-se aos antigénios no interior do cone. Seguidamente procede-se a lavagens que tem por objetivo eliminar os componentes não fixados (Figura 3).

Numa fase posterior são aspiradas imunoglobulinas monoclonais de rato anti-imunoglobulinas humanas conjugadas com fosfatase alcalina para o interior do cone, ligando-se às imunoglobulinas humanas previamente fixadas ao antigénio (Figura 3).





**Figura 3** – Princípio imunoenzimático utilizado pelo equipamento miniVidas®. Retirado de <http://www.biomerieux-diagnostics.com/vidas-solution>.

Por fim é chegada a fase de revelação em que é aspirado o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato que é hidrolisado pela enzima do conjugado resultando um substrato que emite fluorescência a 450 nm. O valor do sinal de fluorescência é proporcional à concentração de anticorpo presente na amostra.

São exemplos de testes que utilizam esta técnica o doseamento dos anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG, anti- Citomegalovírus IgG e IgM.

### 1.2.2. Método imunoenzimático por imunocaptura

O princípio do doseamento associa o método imunoenzimático por imunocaptura com uma detecção final em fluorescência.

Neste caso também o cone serve tanto de fase sólida como de pipetagem. Depois de uma fase de diluição do soro, as imunoglobulinas (Ig) são capturadas pelo anticorpo monoclonal presente na parede do cone. As Ig são detetadas especificamente pelo antígeno inativado. O teste é revelado por um anticorpo monoclonal de murino conjugado com fosfatase alcalina. O método de revelação é igual ao método de Sandwich em que é detetada a fluorescência emitida a 450 nm.

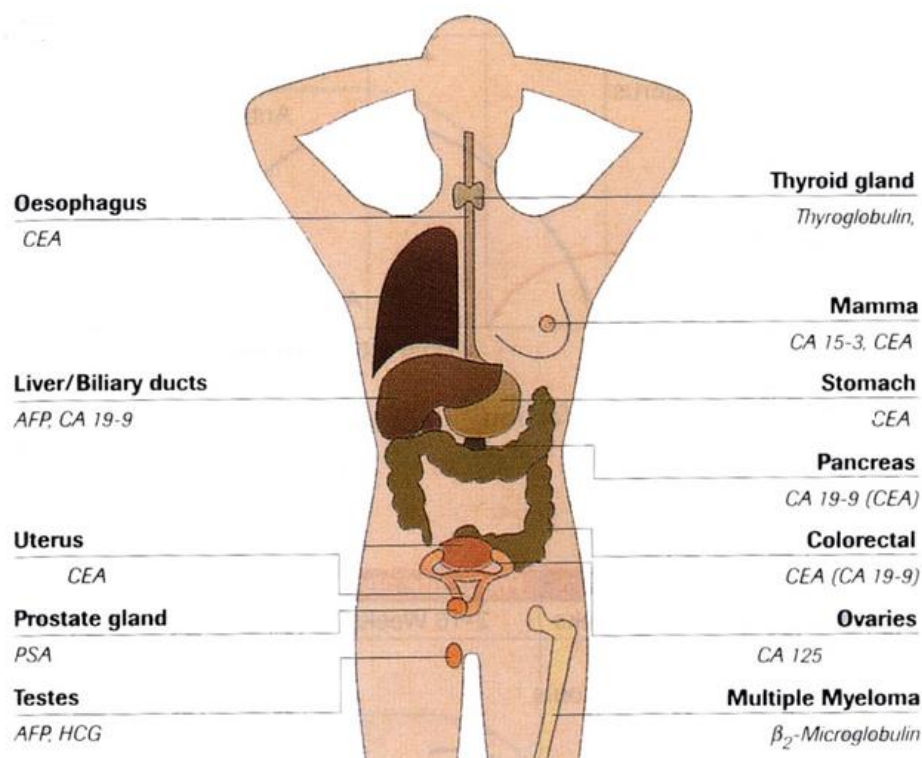
É exemplo deste método o doseamento dos anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgM.

## 2. Marcadores Tumorais

Hoje em dia, tem-se recorrido aos chamados marcadores tumorais na avaliação de tumores e danos tumorais, contudo verifica-se que alguns deles carecem de especificidade, sensibilidade e a sua libertação não é imediata. Assim, é fundamental que haja a descoberta de novas moléculas capazes de antecipar o dano, permitindo não só identificar a lesão como também recorrer a uma terapêutica que a reverta.

As principais propriedades que um marcador tumoral ideal deve possuir são:

- Ser produzido, especificamente, por um tecido maligno ou pré-maligno que tenha predisposição de progressão para a malignidade.
- Ser produzido em níveis elevados em todos os pacientes.
- Ser específico do órgão.
- Doseamento de fácil acessibilidade nos fluidos corporais durante a fase pré-maligna.



**Figura 4** – Diagrama de alguns marcadores tumorais mais frequentemente encontrados nos tumores dos vários órgãos. Adaptado de <https://www.hsc.com.my/cancer-screening.php>.

## **2.1. Alfa-Fetoproteína (AFP)**

A AFP é uma glicoproteína semelhante à albumina sintetizada em elevadas quantidades no saco vitelino e no fígado, durante o desenvolvimento embrionário. A AFP é uma das proteínas em maior quantidade na circulação fetal, contudo os seus níveis decrescem doze meses após o nascimento (Amayo e Kuria, 2009). A concentração sérica num adulto saudável é <10 ng/mL. Esta concentração surge aumentada nos cancros do fígado e do testículo.

A determinação sérica da AFP auxilia no diagnóstico, prognóstico e monitorização do carcinoma hepatocelular primário, uma vez que cerca de 60-90% dos doentes têm níveis séricos >500 ng/mL. Até ao momento ainda não se conseguiu estabelecer qualquer correlação entre a concentração de AFP e o tamanho, taxa de crescimento, o estágio e o grau de malignidade do tumor. Normalmente, valores de AFP muito elevados indicam a presença de carcinoma hepatocelular primário.

Como os valores de AFP aumentam durante a regeneração do fígado, observam-se valores moderadamente elevados na cirrose hepática provocada pelo consumo de álcool e na hepatite viral aguda.

Nos tumores não seminomatosos do testículo há também um aumento da AFP associado a uma elevação da Hormona Gonadotrofina Coriónica ( $\beta$ -hCG) (Malati, 2007).

## **2.2. Antígeno Carcino-Embrionário (CEA)**

O CEA é uma glicoproteína oncofetal que é expressa normalmente nas células das mucosas em concentrações <5 ng/mL e no soro fetal, contudo é sobre expressa em adenocarcinomas, em especial no cancro cólon-rectal, onde apresenta taxas séricas >25 ng/mL. O aumento moderado do CEA também pode surgir em fumadores ou doenças benignas dos intestinos, do pâncreas, do fígado e dos pulmões, tais como pancreatite, hipotireoidismo, cirrose e obstrução biliar, doença de Crohn e retocolite hemorrágica, contudo raramente acima de 10 ng/mL (Perkins *et al.*, 2003).

A determinação do CEA é usada como um teste auxiliar no prognóstico da patologia e ainda ajuda na monitorização dos doentes, uma vez que após o tratamento, a concentração de CEA diminui (Malati, 2007).

### **2.3. Antígeno Carbohidrato 19.9 (CA 19.9)**

O CA 19.9 é um marcador de câncros gastrointestinais, e é utilizado principalmente para o carcinoma pancreático. Contudo, o seu doseamento também é usado para o diagnóstico de carcinoma gástrico e cólon-rectal (Amayo e Kuria, 2009).

Em 99,6% dos indivíduos saudáveis os valores séricos de CA 19.9 são <37 U/mL. Valores <100 U/mL são considerados como uma “zona cinzenta” em que doenças benignas e malignas se podem sobrepor. Nos tumores malignos, valores >100 U/mL podem ser observados.

O CA 19.9 não é específico nem do tumor nem do órgão. No entanto apresenta especificidade de 95% e sensibilidade de 85% para o carcinoma pancreático (Malati, 2007). Não existe qualquer correlação entre a massa tumoral e os valores de CA 19.9, porém os doentes com níveis séricos de CA 19.9 superiores a 10000 U/mL apresentam, quase sempre, metástases distais.

Para além do auxílio no diagnóstico, a sua determinação está sobretudo correlacionada com a resposta clínica ao tratamento (Malati, 2007).

### **2.4. Antígeno Carbohidrato 125 (CA125)**

O CA125 é uma glicoproteína de alto peso molecular que é utilizado essencialmente como marcador tumoral no cancro do ovário. Na população saudável os níveis séricos de CA 125 são <35 U/mL. Se os níveis forem  $\geq 35$  U/mL há a indicação de uma possível patologia (Medeiros *et al.*, 2009).

No geral, cerca de 50% dos doentes com cancro do ovário no estágio I e 90% nos estádios II a IV apresentam aumento nos níveis de CA 125. Atualmente, o CA 125 é utilizado no diagnóstico do cancro do ovário, para avaliar a excisão completa do órgão e para o diagnóstico de recorrências (Coussy *et al.*, 2011).

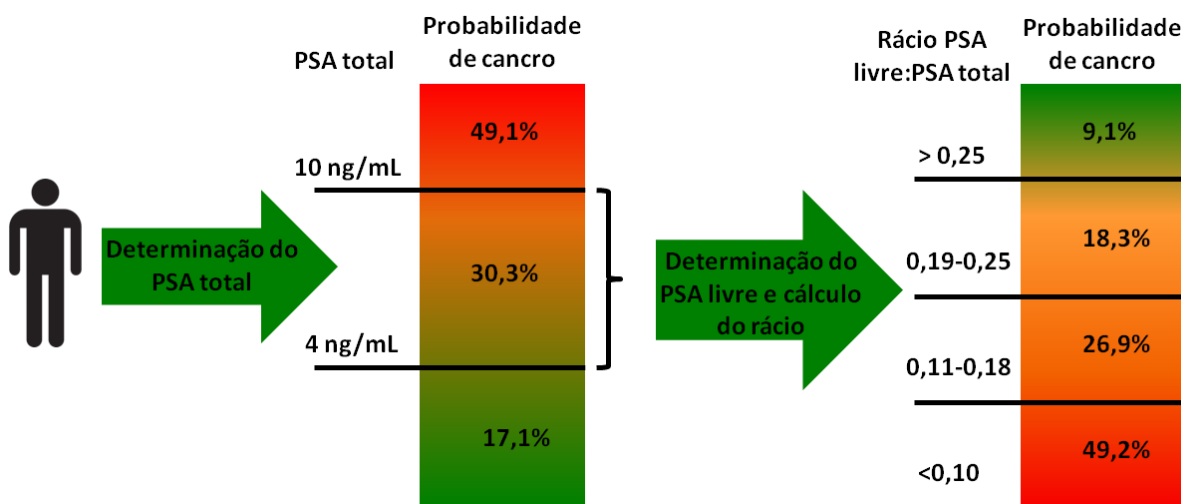
Apesar desta sensibilidade e especificidade para o cancro do ovário, o CA 125 pode encontrar-se aumentado também em doenças malignas do cólon, da mama ou do trato gastrointestinal e em afeções ginecológicas benignas, como por exemplo endometrioses (Amayo e Kuria, 2009).

## 2.5. Antígeno Específico da Próstata (PSA)

O PSA é uma glicoproteína com função de uma enzima (protease) produzida pelo epitélio prostático e os seus níveis podem estar aumentados em prostatites, hipertrofia prostática benigna, trauma prostático e cancro da próstata, bem como após uma ejaculação (Perkins et al., 2003).

A grande maioria do PSA é encontrado no fluido seminal, contudo uma pequena quantidade pode ser encontrada no sangue, onde grande parte vai ser complexado com inibidores de proteases, sendo a fração livre apenas 5-15% do PSA total.

Os valores séricos do PSA são úteis para diagnosticar e determinar a extensão do cancro da próstata e também saber a resposta ao tratamento. Geralmente, os indivíduos saudáveis têm concentrações inferiores a 4 ng/mL, contudo no caso do cancro da próstata, o valor pode permanecer normal, pelo que devem ser realizados outros exames de diagnóstico.



**Figura 5** – Relação entre as concentrações de PSA total e o rácio PSA livre:PSA total e a probabilidade de desenvolver cancro da próstata. Adaptado de <http://www.cobas.com/home/product/clinical-and-immunochemistry-testing/electsys-total-PSA-and-free-PSA.html>.

Quando a concentração é >10 ng/mL a probabilidade de cancro da próstata é elevada e a biópsia é geralmente recomendada. O intervalo de concentrações 4 – 10 ng/mL é descrito como uma zona cinzenta em que é recomendado a determinação da fração de PSA livre e do rácio PSA livre: PSA total, que quanto mais baixo, maior é o risco de desenvolver cancro da próstata, como está indicado na Figura 5 (Adhyam e Gupta, 2012).

## 2.6. Tiroglobulina (Tg)

A Tg é uma glicoproteína específica da tiroide que é usada como precursor para as hormonas da tiroide, e constitui a proteína mais abundante que é produzida e armazenada nos folículos tiroideios (Pittman e Pittman, 1966).

Pequenas quantidades de Tg são detetadas no sangue em concentrações <55 ng/mL em indivíduos saudáveis, uma vez que aquando da síntese da Tg nos tirócitos e o seu transporte para os folículos a passagem de pequenas quantidades para a circulação é possível. O doseamento da Tg não é aconselhado como um meio de diagnóstico de cancro da tiroide, uma vez que os níveis séricos se podem sobrepor a níveis encontrados em indivíduos saudáveis ou com doenças benignas da tiroide. O seu doseamento é útil para detetar a persistência ou a recorrência da doença (Whitley e Ain, 2004).

Devido à especificidade da Tg, após a remoção completa da tiroide durante um tratamento para o cancro da tiroide, concentrações >1 ng/mL são consideradas suspeitas de recorrência da doença (Cooper *et al.*, 2009).

## 2.7. $\beta$ 2 – Microglobulina ( $\beta$ -2 M)

A  $\beta$ -2 M é uma pequena proteína de membrana que constitui a cadeia leve dos antígenos de histocompatibilidade de classe I e que é expressa na superfície de células nucleadas normais bem como em células de linhas celulares tumorais. Desde a sua descoberta que a  $\beta$ -2 M tem sido utilizada como indicador da função renal, e também como marcador em certos cancros, doenças autoimunes e infeções virais (Bethea e Forman, 1990).

A  $\beta$ -2 M é encontrada em baixas concentrações séricas (<3 mg/dL) em indivíduos saudáveis. Uma vez que a superfície dos linfócitos e monócitos são particularmente ricas em  $\beta$ -2 M, o seu aumento é observado em condições caracterizadas por ativação e/ou proliferação linfocitária como por exemplo no Mieloma Múltiplo, Leucemia Monocítica, Linfossarcoma e Linfoma de Não-Hodgkin (Bethea e Forman, 1990).

A determinação da  $\beta$ -2 M é também útil na monitorização de doenças renais, dado que apresenta um baixo peso molecular, sendo facilmente filtrada através do glomérulo. Após a filtração, 99,9% da  $\beta$ -2 M é reabsorvida no túbulo proximal por endocitose. Tendo em conta estas características, a determinação sérica é útil no acompanhamento de alterações da taxa

de filtração glomerular e uma excreção urinária  $>370 \mu\text{g}/24\text{h}$  é indicativo de disfunção tubular (Bethea e Forman, 1990).

Este parâmetro é um marcador sobretudo em doentes de diálise que o executam anualmente, em perfil pré-estabelecido entre a clínica de diálise e o laboratório.

### 3. Endocrinologia

#### 3.1. **Função Tiroideia**

##### 3.1.1. Hormona Estimulante da Tiroide (TSH)

A TSH é secretada pela glândula pituitária anterior em resposta ao mecanismo de retroalimentação negativo das hormonas da tiroide circulantes, atuando diretamente no recetor da TSH (TSH-R), que se encontra expresso na membrana basolateral das células foliculares da tiroide. A TSH regula a captação de iodo mediada pelo canal  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ , seguindo-se uma série de etapas necessárias para uma normal síntese e secreção das hormonas da tiroide (Brent, 2012). As hormonas secretadas quando ligadas a recetores intranucleares funcionam como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes. Estas hormonas têm efeito no crescimento e desenvolvimento do feto, criança e adolescente, e elas regulam a termogénese corporal e a taxa metabólica (Ashwood, 2012).

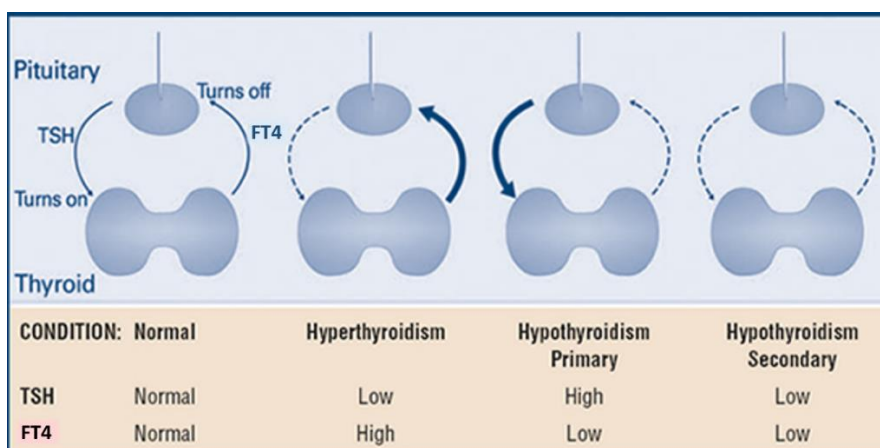
A concentração de TSH, em indivíduos saudáveis, encontra-se entre 0,27  $\mu\text{UI}/\text{mL}$  e 4,20  $\mu\text{UI}/\text{mL}$ . Todavia, em indivíduos com Hipertiroidismo (patologia caracterizada por secreção excessiva de hormonas) a concentração é  $<0,05 \mu\text{UI}/\text{mL}$ . Pelo contrário, indivíduos com Hipotiroidismo (patologia caracterizada por uma deficiente secreção de hormonas da tiroide) têm concentrações elevadas de TSH.

##### 3.1.2. Tiroxina Livre (FT4) e Tiroxina (T4)

As células epiteliais da tiroide captam iodo e secretam tiroglobulina para o lúmen do foliculo. Em resposta ao estímulo da TSH, a tiroide produz 3,5,3',5'-tetraiodotironina ou tiroxina (T4) e 3,5,3'-triiodotironina ou triiodotironina (T3). Apesar da T4 e T3 serem sintetizadas na glândula tiroideia, o maior produto de secreção é a T4 (Kelly, 2000). Quando a T4 é libertada da tiroide para a circulação, esta vai ser ligada na sua maioria a globulinas, estimando-se que apenas 0,03-0,05% da T4 é que se encontrada na forma livre. Os valores de T4 considerados normais oscilam entre 5,10  $\mu\text{g}/\text{dL}$  e 14,10  $\mu\text{g}/\text{dL}$  enquanto a FT4 é encontrada normalmente em concentrações bastante inferiores, 0,93  $\text{ng}/\text{dL}$  e 1,70  $\text{ng}/\text{dL}$ . Embora a fração livre seja quantitativamente menor, é a única ativa, pelo que a sua determinação está melhor correlacionada com o estado clínico do doente, do que a determinação da T4 total (Ashwood, 2012).



As determinações de TSH e FT4 em conjunto podem fornecer importantes informações de diagnóstico em doentes com disfunção da tiroide como se pode ver na Figura 6.

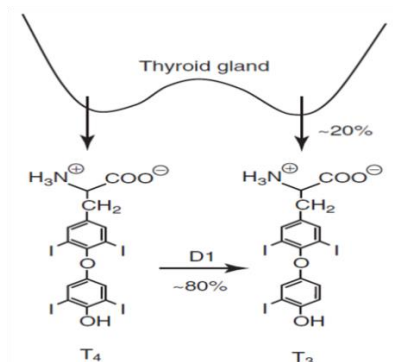


**Figura 6** – Relação entre a TSH e FT4. Tiroide e Hipófise como um termóstato que regulam os níveis hormonais. Adaptado de <http://www.thyroid.org/thyroid-function-tests/>.

Tendo como base a determinação da TSH e FT4, o hipotireoidismo primário surge com concentrações baixas de FT4 e concentrações elevadas de TSH, enquanto no caso do hipertireoidismo são encontradas elevadas concentrações de FT4 e concentrações baixas de TSH. No caso do Hipotireoidismo Secundário tanto a TSH como a FT4 estão diminuídas, causado na maioria das vezes por patologias na pituitária.

### 3.1.3. Triiodotironina Livre (FT3) e Triiodotironina Total (T3)

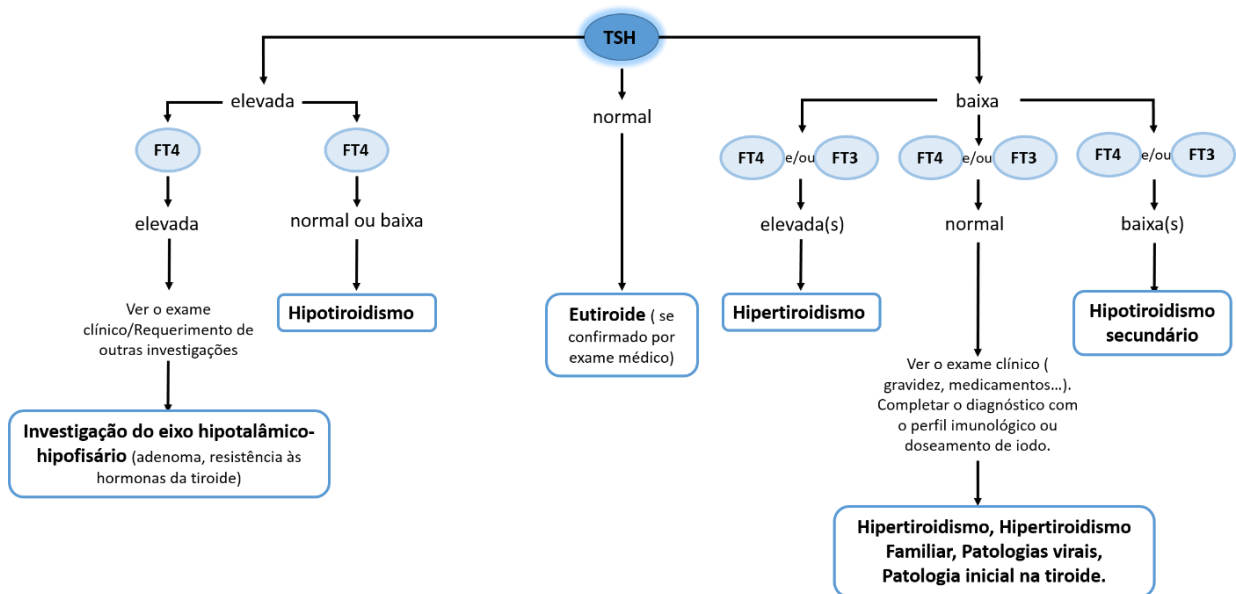
A triiodotironina resulta em cerca de 80% da desiodação da T4 e apenas 20% da T3 é libertada diretamente da tiroide (Figura 7). Tal como a T4, a T3 está ligada a proteínas, onde apenas cerca de 0,3% do total de T3 circula livremente no plasma (Ashwood, 2012).



**Figura 7** – Fontes metabólicas da T3 e T4. Retirado de EDWARD R. ASHWOOD, David E. Brun. Burtis Carl A. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. ISBN 9781416061649.

A T3 e a FT3 são determinadas para testar a função da tiroide, principalmente se houver uma anormalidade na TSH e a FT4 não surgir alterada, como acontece em alguns adenomas tóxicos que secretam preferencialmente a T3.

A Figura 8 representa um algoritmo com um painel completo de testes (FT4, FT3 e TSH) que são fundamentais para a identificação, compreensão, e monitorização dos distúrbios da tiroide. Para determinar a etiologia da doença também se determinam auto-anticorpos como Anti-Tiroperoxidase (A-TPO) e Anti-Tiroglobulina (A-Tg).



**Figura 8** – Algoritmo para avaliação laboratorial da função da tiroide. Adaptado de EDWARD R. ASHWOOD, David E. Brun. Burtis Carl A. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. ISBN 9781416061649.

### 3.1.4. Anti-Tiroperoxidase

A tiroperoxidase (TPO) é uma enzima envolvida na síntese das hormonas da tiroide, catalisando a oxidação do iodo nos resíduos de tirosina ligados à tiroglobulina. Quando é diagnosticada uma patologia na tiroide, o médico recomenda o doseamento dos anticorpos A-TPO para saber qual a causa da patologia. A presença de A-TPO no sangue sugere que a causa da patologia é autoimune, como a Doença de Hashimoto ou Doença de Graves. Níveis de A-TPO <34 UI/mL são considerados fisiológicos, contudo em 90% dos casos de Doença de Hashimoto e em cerca de 70% dos casos de Doença de Graves, os títulos de A-TPO encontram-se elevados. Nestas doenças autoimunes, os anticorpos produzidos pelo nosso sistema imunológico atacam equivocadamente o tecido normal causando inflamação e degradação da tiroide.

Na Doença de Hashimoto, como consequência da destruição da tiroide, a produção de hormonas começa a ser deficiente, originando hipotireoidismo. Pelo contrário, a Doença de Graves é um problema autoimune que estimula a tiroide a produzir hormonas em excesso causando hipertireoidismo.

### 3.1.5. Anti-Tiroglobulina

A Tg é produzida na tiroide e constitui um componente central no lúmen do folículo tiroideio. Em sinergia com a enzima TPO, a Tg desempenha uma função essencial na formação das hormonas T4 e T3. Os valores de referência estabelecidos como fisiológicos são <115 UI/mL. Os indivíduos com tiroidite por autoimunidade apresentam concentrações séricas aumentadas de anticorpos anti-Tg. Quando concentrações elevadas de A-Tg e A-TPO surgem juntamente indicam tiroidite com infiltração linfocitária crónica (doença de Hashimoto). A determinação dos anticorpos A-Tg é importante na monitorização da evolução da Doença de Hashimoto.

## 3.2. Função Gonadal/Hormonas Sexuais

### 3.2.1. Hormona Luteinizante (LH)

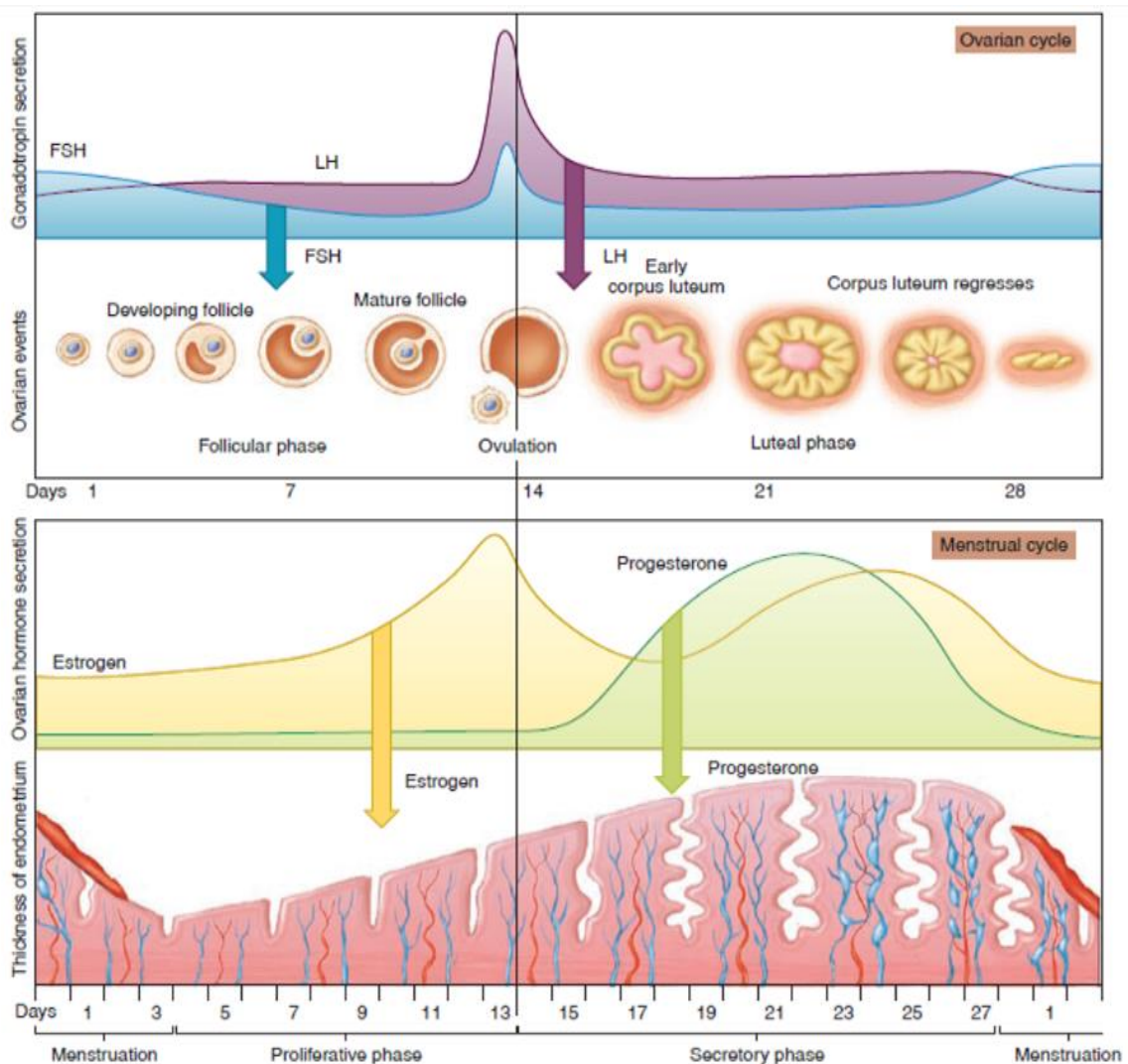
A LH é uma hormona que pertence à classe das gonadotrofinas e tem como funções promover e manter a segunda fase do ciclo menstrual, nas mulheres auxilia na formação do corpo lúteo e nos homens estimula o desenvolvimento e a atividade funcional das células de Leydig testiculares a produzir testosterona (Ashwood, 2012).

O doseamento da LH é requerido para avaliar problemas menstruais, fertilidade e o início da puberdade. Na Tabela 2 estão referidos os intervalos de referência da LH em diferentes fases menstruais, na menopausa e nos homens.

**Tabela 2** – Valores de referência da LH e FSH encontrados em diferentes fases do ciclo menstrual, em situações de pós-menopausa e nos homens.

	[LH] mUI/mL	[FSH] mUI/mL
Fase folicular	1,0-18,0	3,50-12,50
Fase ovulatória	24,0-105,0	4,70-21,50
Fase luteínica	0,4-20,0	1,70-7,70
Pós-Menopausa	15,0-62,0	25,8-134,8
Homens	1,62-10,05	1,37-13,58

As concentrações de LH mais elevadas surgem durante a fase ovulatória, induzindo a ovulação e a formação do corpo lúteo, cujo principal produto segregado é a progesterona (Figura 9).



**Figura 9** – Alterações ováricas e hormonais durante um ciclo menstrual normal. Retirado de Fox, Stuart Ira, Human Physiology, 12<sup>th</sup>, McGraw Hill.

### 3.2.2. Hormona Folículo-Estimulante (FSH)

Tal como a LH, a FSH pertence à família das gonadotrofinas. A FSH e a LH regulam e estimulam o crescimento e o funcionamento das gónadas (ovários e testículos) de modo sinérgico. As ações da FSH são estimular o crescimento e maturação dos folículos ováricos, estimulam a secreção de estrogénios e estimula a espermatogénese nos homens (Ashwood, 2012).

Nas mulheres, as gonadotrofinas atuam dentro do circuito regulador hipotálamo-hipófise-ovários para controlar o ciclo menstrual. A FSH e a LH são libertadas de forma pulsátil pelas células gonado trópicas da hipófise anterior e são controladas pelas hormonas esteroides, através de um mecanismo de feedback negativo. Nos ovários, a FSH em conjunto com a LH, estimulam o crescimento e amadurecimento do folículo e, por conseguinte, a biossíntese dos estrogénios e progesterona nos folículos.

A concentração de FSH apresenta um pico na fase ovulatória, embora seja menos marcado do que é obtido com a LH (Figura 9). Na menopausa, devido a alterações na função ovárica e uma redução na secreção dos estrogénios, verifica-se a ocorrência de elevadas concentrações de FSH.

### 3.2.3. $17\beta$ – Estradiol

O  $17\beta$  – Estradiol é o principal estrogénio feminino e o mais biologicamente ativo. Cerca de 99% do  $17\beta$  – Estradiol circula ligado especificamente e com elevada afinidade a proteínas de transporte (globulina ligadora de hormonas sexuais – SHBG).

De um modo geral, os estrogénios são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção dos órgãos sexuais femininos. Para além das funções relacionadas com a função gonadal, os estrogénios afetam a homeostase do cálcio e têm um benéfico efeito na massa óssea, uma vez que diminuem a reabsorção óssea (Ashwood, 2012). Os estrogénios são produzidos na sua maioria nos folículos ováricos e no corpo lúteo, mas também é formado em pequenas quantidades nos testículos e no córtex suprarrenal. Numa mulher grávida, os estrogénios são formados principalmente na placenta. É importante reter que o  $17\beta$  – Estradiol participa na regulação do ciclo menstrual, no desenvolvimento da mama e útero e na manutenção da gravidez.

A secreção do  $17\beta$  – Estradiol é bifásica durante o ciclo menstrual, uma vez que as suas concentrações aumentam no pico ovulatório e na fase lútea (Figura 9; Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores de referência da Progesterona e do 17 $\beta$  - Estradiol encontrados em diferentes fases do ciclo menstrual, em situações de pós-menopausa e no 1º Trimestre de gravidez.

	[17 $\beta$ - Estradiol] pg/mL	[Progesterona] ng/mL
Fase folicular	12,5-166,0	0,20-1,5
Fase ovulatória	85,0-498,0	0,8-3,00
Fase lútea	43,8-211,0	1,70-37,0
Pós-Menopausa	5,0-47,0	0,10-0,80
Gravidez 1º Trimestre	215-4300	9,0-47,0

O seu doseamento é clinicamente relevante para a avaliação de problemas de fertilidade no eixo gonado-hipotálamo-hipofisário, ginecomastia, produção de estrogénios por diferentes tumores dos ovários e dos testículos, e hiperplasia do córtex supra-renal.

#### 3.2.4. Progesterona

A progesterona é uma hormona esteroide e é a segunda hormona sexual encontrada em maiores quantidades na mulher. A progesterona em conjunto com os estrogénios, ajudam a regular os órgãos acessórios durante o ciclo menstrual. Por outro lado, esta hormona é especialmente importante na preparação do útero para a implantação do blastocisto e na manutenção da gravidez. Numa mulher não grávida, a progesterona é secretada maioritariamente pelo corpo lúteo, contudo numa mulher grávida a secreção de progesterona é assegurada pela placenta.

A progesterona não é produzida em concentrações significativas até surgir a LH e ocorrer a ovulação, isto é, a progesterona é praticamente indetetável na fase folicular do ciclo menstrual, observando-se um pequeno aumento do nível de progesterona um dia antes da ovulação. Na fase lútea observa-se um aumento na síntese da progesterona, uma vez que esta é sintetizada maioritariamente pelo corpo lúteo (Tabela 3; Figura 9). No 1º trimestre da gravidez também podemos ver (Tabela 3) que há um aumento na produção de 17 $\beta$  – Estradiol e progesterona dado que ambos são responsáveis pela manutenção da gravidez.

A menopausa é definida como a cessação permanente da menstruação como resultado da perda de atividade dos folículos ováricos. Devido a esta perda funcional, a produção de estrogénios em níveis adequados começa a falhar, e como consequência a produção de gonadotrofinas (LH e FSH) aumenta e continua a estimular o ovário (Tabela 2 e 3).

### 3.2.5. Testosterona

A testosterona é um esteroide com 19 carbonos pertencente ao grupo dos androgénios. Os androgénios são responsáveis pela masculinização do trato genital e pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias. A secreção da testosterona é regulada pela LH e está sujeita a um feedback negativo através da hipófise e do hipotálamo. A testosterona é o principal androgénio produzido no homem (Ashwood, 2012) .

A testosterona é sintetizada na sua maioria nas células de Leydig nos testículos e em menores quantidades pela conversão de precursores como a dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (Ashwood, 2012).

Nas mulheres, formam-se pequenas quantidades de testosterona nos ovários. Em concentrações fisiológicas, os androgénios não têm quaisquer efeitos específicos sobre as mulheres. Todavia, um aumento da produção de testosterona nas mulheres pode causar virilismo.

O doseamento da testosterona nas mulheres auxilia no diagnóstico dos ovários poliquísticos e quando existe suspeita de tumor dos ovários ou da suprarrenal. Nos homens, a sua determinação é feita quando há suspeita de uma diminuição na produção como acontece no hipogonadismo ou na cirrose hepática. Os valores de referência da Testosterona nas diferentes fases da vida da mulher e no homem estão encontrados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Valores de referência da Testosterona encontrados em mulheres e homens.

		[Testosterona] ng/mL
Mulheres:	Pré-menopausa	<0,86
	Pós-menopausa	<0,35
	Gravidez	0,76-1,52
Homens:		2,8-8,0

### 3.2.6. Dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-s)

O DHEA-s é uma hormona esteroide produzida a partir do colesterol. Esta hormona tem apenas atividade androgénica fraca, contudo pode ser metabolizada em androgénios mais ativos como a androstenediona e a testosterona. A determinação de valores de DHEA-s elevados é útil no diagnóstico de hirsutismo e virilismo. Outras indicações para a

determinação deste parâmetro são a hiperprolactinémia, o síndrome dos ovários poliquísticos e a exclusão de um tumor produtor de androgénios do córtex suprarrenal.

Os níveis de DHEA-s são normalmente elevados nos recém-nascidos, contudo caem drasticamente logo após o nascimento. Durante a puberdade são atingidas concentrações máximas e após a puberdade, tal como outras hormonas, tendem a diminuir com a idade (Tabela 5).

**Tabela 5** – Valores de Referência da DHEA-s consoante o sexo e a idade.

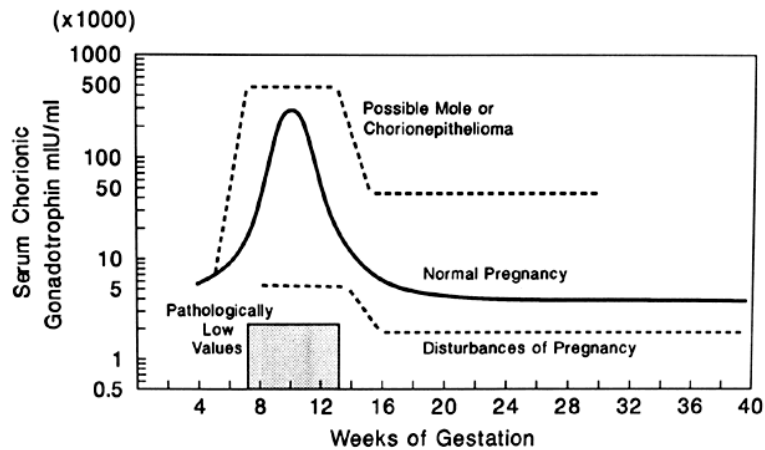
Idade	DHEA-s (µg/dL)	
	Rapaz	Rapariga
1 – 3 anos	6 – 21	6 – 79
4 – 6 anos	5 – 186	6 – 38
7 – 8 anos	10 – 94	13 – 68
9 – 11 anos	16 – 152	14 – 160
12 – 14 anos	18 – 344	23 – 301
15 – 17 anos	47 – 357	39 – 399
18 – 19 anos	10 – 441	145 – 395
	Mulheres	
Pré-menopausa	35 – 430	
Pós-menopausa	10 – 190	
	Homens	
	80 – 560	

### 3.2.7. Gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG)

À semelhança da LH, FSH e da TSH, a  $\beta$ -hCG é um membro da família das glicoproteínas. A sua ação biológica é manter o corpo lúteo durante a gravidez e também tem influência na produção de esteroides.

A determinação da concentração de  $\beta$ -hCG permite efetuar o diagnóstico de gravidez logo uma semana após a conceção (Figura 10).





**Figura 10** – Variação dos níveis de  $\beta$ -hCG durante a gestação. Retirado de: Hammond, C, Soper, J, *Glob. libr. women's med.*, (ISSN: 1756-2228) 2008; DOI 10.3843/GLOWM.10263.

A determinação da  $\beta$ -hCG no 1º trimestre da gravidez é de especial importância. Nestes casos, os valores elevados funcionam como indicador de carcinoma coriônico, mola hidatiforme ou gravidez múltipla. Os valores deprimidos indicam ameaça de aborto ou gravidez ectópica.

### 3.2.8. Prolactina (PRL)

A PRL é secretada na adeno-hipófise e a sua função biológica é estimular e sustentar a lactação no período pós-parto após as glândulas mamárias terem sido preparadas por outras hormonas como os estrogénios, progesterona, hormona do crescimento e insulina.

A PRL é encontrada no soro em três formas diferentes. A forma monomérica que é biológica e imunologicamente ativa e é a predominante (80%), a forma dimérica que é biologicamente inativa e ainda a forma tetramérica que possui baixa atividade biológica.

Durante a gravidez, a concentração de PRL aumenta sob a influência da produção elevada de estrogénio e da produção de progesterona.

A hiperprolactinémia (nos homens e mulheres) é a principal causa dos problemas de fertilidade, pelo que o seu doseamento é utilizado no diagnóstico dos ciclos anovulatórios, da amenorreia hiperprolactinémica e da galactorreia. Numa mulher saudável, a concentração de PRL encontra-se entre 6,0 e 29,9 ng/mL e nos homens encontra-se entre 4,6 e 21,4 ng/mL.

### 3.3. Homeostase do Cálcio

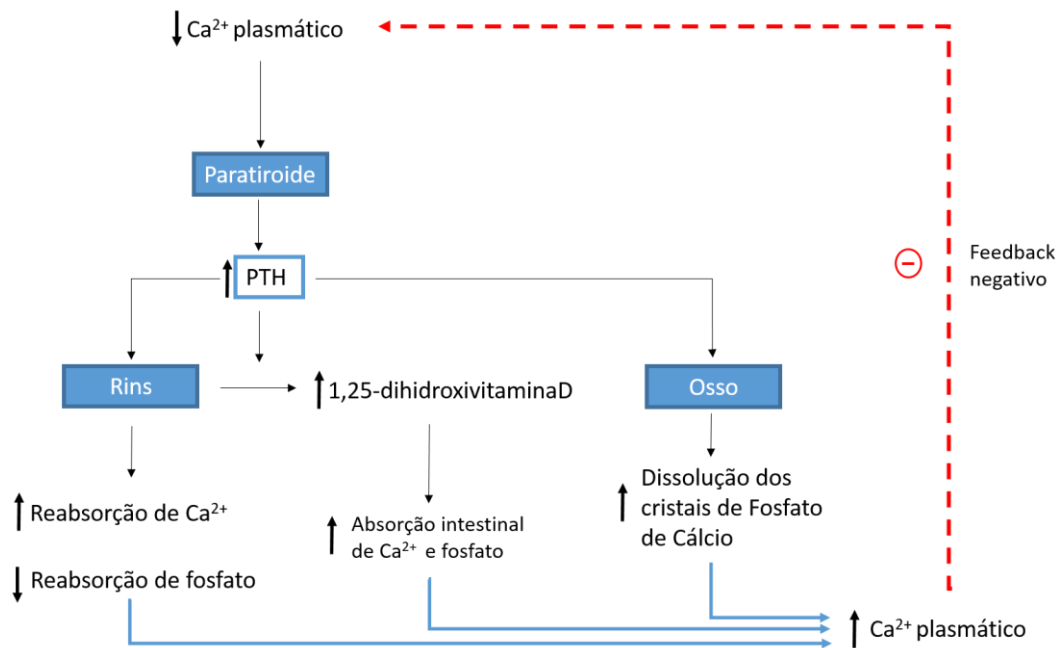
O Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é o quinto elemento mais comum no corpo e o cátion mais prevalente. O teor de  $\text{Ca}^{2+}$  num adulto corresponde ligeiramente a mais de 1 kg, ou seja, cerca de 2% do peso corporal. Deste, cerca de 99% está presente sob a forma de hidroxiapatite de cálcio nos ossos e cerca de 1% encontra-se no espaço extracelular. O nível de  $\text{Ca}^{2+}$  no soro está em equilíbrio dinâmico com a fração de cálcio ósseo. A concentração plasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  é, em média, 9,5 mg/dL. No plasma, o  $\text{Ca}^{2+}$ , é encontrado em três estados físicos: 50% circula livre, 40% ligado a proteínas do plasma e 10% complexado com pequenos aniões orgânicos. A fração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre é a forma biologicamente ativa e é regulado pela Hormona da Paratiroide (PTH) e pela 1,25-dihidroxitamina D (Ashwood, 2012).

#### 3.3.1. Hormona da Paratiroide (PTH)

A PTH é sintetizada, armazenada e libertada pelas células principais da glândula paratiroide. A sua concentração no sangue é determinada pela síntese e secreção na glândula paratiroide e pelo metabolismo no fígado e rim. Os reguladores primários da PTH são o  $\text{Ca}^{2+}$ , a Vitamina D e o Fosfato.

A PTH vai atuar diretamente sobre o osso e rim de modo a aumentar a concentração plasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  e diminuir a de Fosfato. A PTH promove o aumento da concentração de cálcio através de três mecanismos: estimula a reabsorção óssea, o que promove a passagem de cálcio e fosfato para o sangue, estimula o rim (túbulo distal) a reabsorver cálcio e a libertar fosfatos, e por fim estimula o rim a produzir  $1\alpha$ -hidroxilase para converter a forma inativa de vitamina D na forma ativa que irá posteriormente aumentar a reabsorção de cálcio e Fosfato no epitélio intestinal (Figura 11). Uma exposição crónica a elevadas concentrações de PTH conduz a um aumento da reabsorção óssea. A concentração de PTH em pessoas saudáveis encontra-se entre 15 e 65 pg/mL.

A reabsorção óssea é importante para a homeostase do cálcio, contudo há uma degradação do esqueleto.



**Figura 11** – Homeostase do Cálcio plasmático. Mecanismo de feedback negativo que promovem o retorno do cálcio aos níveis normais sem aumento simultâneo do fosfato plasmático acima do normal. Adaptado de EDWARD R. ASHWOOD, David E. Brun. Burtis Carl A. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. ISBN 9781416061649.

### 3.3.2. 25-Dihidroxicálciferol

A Vitamina D é produzida endogenamente através da exposição solar, e é absorvida a partir de alimentos que a contenham ou suplementos. A vitamina é metabolizada na sua forma ativa, 1,25-dihidroxicálciferol, que irá regular o metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$  e Fosfato. Uma concentração deficiente desta vitamina pode comprometer a formação do osso, conduzir a raquitismo nas crianças e osteomalacia nos adultos.

A vitamina D que é ingerida nos alimentos ou produzida através da exposição solar é metabolizada a 25-hidroxicálciferol, que é biologicamente inativa no que se refere ao metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo posteriormente metabolizada à forma ativa de 1,25-dihidroxicálciferol. A concentração normal é de 15-60 ng/mL, sendo regulada pela PTH, fosfato e cálcio, e o seu tempo de meia-vida é de 4-6 horas. Devido ao curto tempo de meia-vida, os médicos prescrevem maioritariamente o doseamento da 25-hidroxicálciferol que se deve encontrar em valores superiores a 30 ng/mL, contudo inferiores a 100 ng/mL.

A PTH, a hipofosfatemia e a hipocalcemia aumentam a síntese de 1,25-dihidroxitamina D, todavia a hipocalcemia atua indiretamente na concentração da 1,25-dihidroxitamina D (Figura 11) (Ashwood, 2012).

## 4. Virologia

### 4.1. **Hepatites**

Entende-se por hepatite uma inflamação do fígado que pode ter inúmeras causas. A causa mais comum é a infecção viral, mais frequentemente vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV) ou vírus da hepatite C (HCV). Causas mais raras incluem infecção com vírus Epstein-Barr, rubéola e vírus da febre amarela. Se a causa for viral, o corpo prepara uma resposta imunológica para atacar o vírus. Uma vez que é necessário a entrada do vírus para o interior dos hepatócitos para que estes sejam replicados e haja produção de mais vírus, o sistema imunológico atua nos tecidos do fígado acabando por criar danos neste (Guidotti e Chisari, 2006).

#### 4.1.1. Vírus da Hepatite A

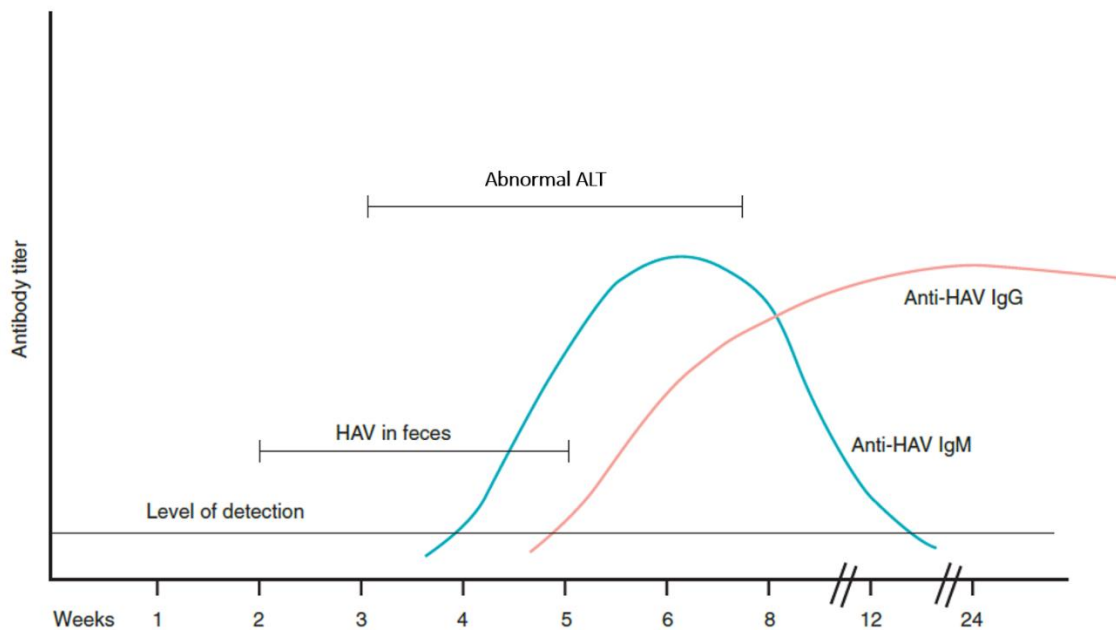
O HAV pertence à família *Picornaviridae* e ao género *Hepatovirus* sendo o Homem o principal hospedeiro natural. O HAV é um vírus pequeno, não envelopado e o seu genoma é constituído por *Ribonucleic acid* (RNA) de cadeia simples de polaridade positiva. O vírus entra por via oral e replica-se no trato gastrointestinal criando um período de virémia transitório. Posteriormente é transportado até ao fígado onde se replica e é libertado por exocitose, sendo excretado na bÍlis, transportado para os intestinos e excretado por fim nas fezes (Matheny e Kingery, 2012).

Globalmente, o HAV é a causa líder da icterícia infecciosa surgindo a cada ano cerca de 1,4 milhões de infeções. A sua transmissão é geralmente por via fecal-oral, pelo que áreas onde os padrões de saneamento são baixos, tais como regiões de África, Ásia e América Latina, a prevalência é de quase 100% em crianças com menos de 5 anos (Matheny e Kingery, 2012).

O diagnóstico da infeção é realizado através da determinação das concentrações de anticorpos específicos para o vírus da Hepatite A em amostras sanguíneas dos doentes. A imunoglobulina M (IgM) específica para o HAV é produzida no início da infeção e a quantidade no sangue aumenta nas 4-6 semanas seguintes bem como a atividade enzimática da alanina-aminotransferase (ALT) (Figura 12).

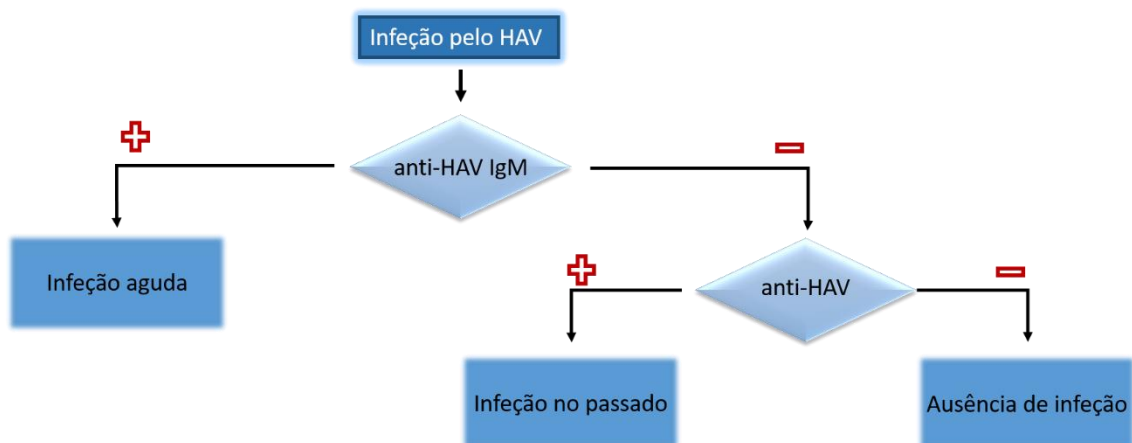
Ao longo dos 3-6 meses seguintes, as concentrações decrescem para níveis indetetáveis. Durante este tempo também a atividade enzimática da ALT retorna ao normal. A IgM

específica para o HAV dá lugar à imunoglobulina G (IgG) específica para o HAV, que confere proteção contra uma reinfeção com HAV (Figura 12).



**Figura 12** – Linha temporal das manifestações do Vírus da Hepatite A. Adaptada de MAHON, Connie R. et al. - Textbook of Diagnostic Microbiology ISBN 0323089887.

No diagnóstico são usados dois testes para detetar a infeção pelo HAV: deteção de imunoglobulina M específica para HAV (anti-HAV IgM) e deteção do total de anticorpos específicos para o vírus da Hepatite A (anti-HAV). Um resultado positivo para anti-HAV só por si não pode diferenciar entre infeções agudas e crónicas. É, portanto, necessário um resultado positivo para anti-HAV IgM para se confirmar a presença de infeção aguda. A determinação de anti-HAV pode ser utilizada para determinar o estado imunitário após vacinação (Figura 13).



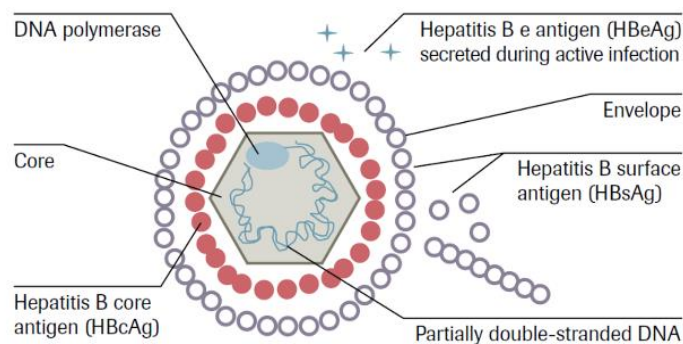
**Figura 13** – Algoritmo para o diagnóstico da Hepatite A. Adaptado de Elecsys® Hepatitis testing - Powerful tools for patient oriented decision making.

#### 4.1.2. Vírus da Hepatite B (HBV)

A Hepatite B é transmitida por um vírus envelopado com um genoma circular com dupla cadeia de ácido desoxirribonucleico (DNA) parcialmente incompleta (Figura 14). O HBV é transmitido por via percutânea, sexualmente e perinatal, afetando cerca de 350-400 milhões de pessoas em todo o mundo.

O HBV pode causar tanto infecção crônica como aguda. A infecção crônica é difícil de eliminar uma vez que o DNA viral pode ser integrado no genoma do hospedeiro. No caso da infecção aguda, após a infecção o período de incubação é de 1-6 meses, onde o vírus se espalha pelo fígado. Nesta fase, o sistema imunitário do hospedeiro ataca o vírus como uma tentativa de resolver a infecção. Como o vírus se replica nos hepatócitos, o sistema imunitário causa danos no fígado, libertando-se ALT para o sangue. Apenas um pequeno número de doentes com Hepatite B aguda progride para hepatite fulminante.

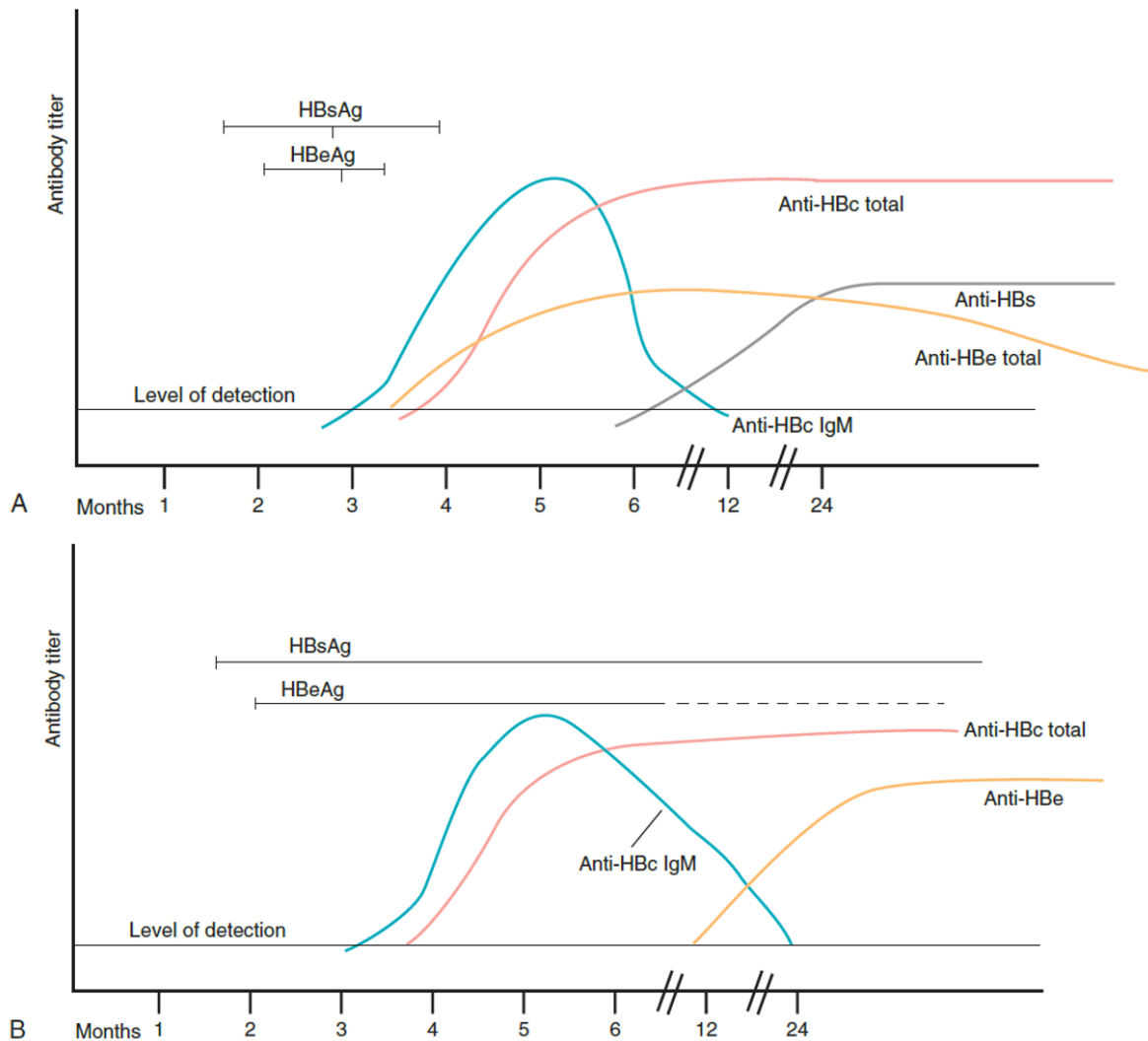
As proteínas virais têm grande importância clínica para o diagnóstico da patologia, nomeadamente a glicoproteína do envelope (AgHBs), a proteína estrutural da cápside (AgHBc) e uma proteína solúvel da cápside (AgHBe) (Figura 14) (Trépo *et al.*, 2014).



**Figura 14** – Estrutura do vírus da Hepatite B. Retirado de Elecsys® Hepatitis testing - Powerful tools for patient oriented decision making.

O diagnóstico da presença e fase da infecção por HBV são conseguidos através da determinação dos marcadores séricos mencionados acima. Numa infecção aguda, o AgHBs pode ser detetado 1 a 6 semanas antes dos sintomas físicos serem observados. Anticorpos para o AgHBc (anti-HBc) podem ser detetados a partir de 1-2 semanas da deteção do AgHBs e permanecer elevado por 6 meses após o desaparecimento do título de AgHBs, o que indica a resolução da infecção aguda. A determinação de AgHBe indica a presença de uma infecção recente. Os anticorpos para o AgHBs (anti-HBs) podem ser detetados 1-2 meses

depois do desaparecimento do AgHBs. A detecção de anti-HBs e anti-HBc IgG indicam uma infecção resolvida (Figura 15-A). A persistência de AgHBe por mais de 10 semanas e AgHBs por mais de 6 meses sugerem que existe uma progressão para infecção crónica (Figura 15-B) (Anexo I).



**Figura 15 –** (A) Curso serológico típico de uma hepatite B aguda com cura. (B) Curso serológico típico de uma hepatite B aguda com progressão para Hepatite B crónica. Adaptado de MAHON, Connie R. *et al.* - Textbook of Diagnostic Microbiology ISBN 0323089887.

#### 4.1.3. Vírus da Hepatite C (HCV)

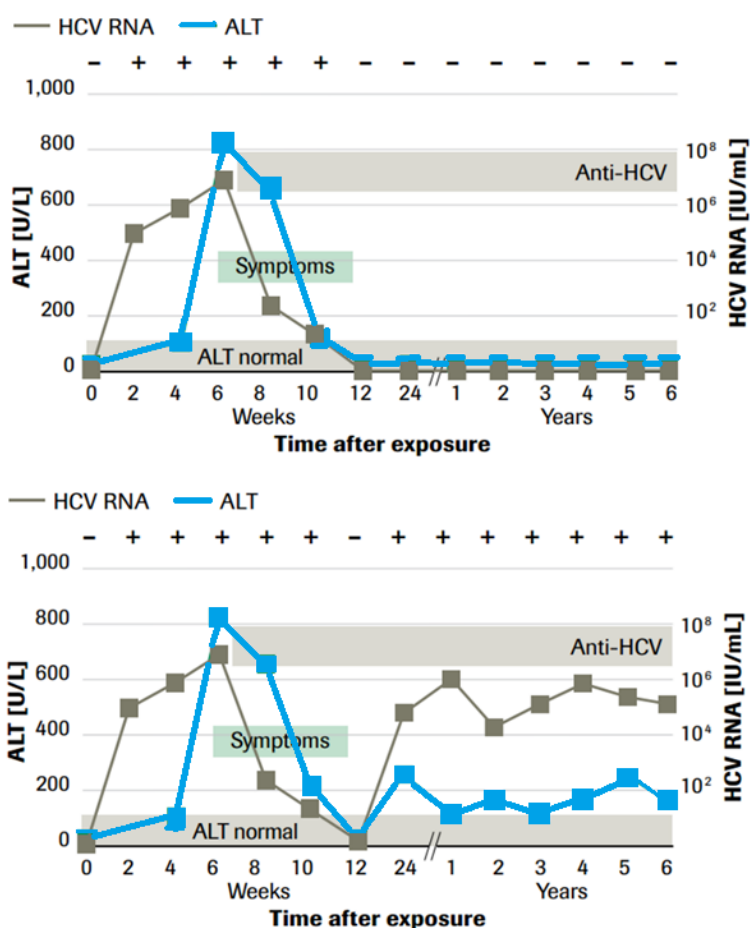
O vírus da Hepatite C é um membro da família *Flaviviridae*, o seu genoma é constituído por uma cadeia simples de RNA de polaridade positiva e possui envelope. A infeção por este vírus pode manifestar-se como uma infeção aguda ou crónica. A hepatite aguda é habitualmente assintomática e raramente leva à falha hepática. Todavia cerca de 60-80% dos doentes com infeção aguda desenvolvem infeção crónica (Modi e Liang, 2008).



O diagnóstico da infeção pelo HCV pode ser detetado determinando as concentrações de RNA do HCV, ALT e imunoglobulinas específicas para o HCV (anti-HCV) nas amostras de soro dos doentes. Estes valores também indicam se se trata de uma infeção aguda ou crónica.

Numa infeção aguda, os níveis de RNA do vírus da Hepatite C aumentam nas primeiras semanas após a infeção atingindo o máximo quando os sintomas aparecem. Os níveis da ALT também aumentam ao mesmo tempo. As imunoglobulinas específicas para o vírus podem ser detetadas a partir do início dos sintomas (Figura 16-A).

Na infeção crónica por HCV, o RNA do HCV pode ser detetado anos após a infeção. Nas fases iniciais, os níveis de RNA do HCV e de ALT são similares com os da fase inicial da infeção aguda. Os níveis de anti-HCV aumentam para níveis altos durante a infeção crónica e marcam os níveis de flutuações do RNA do HCV e da ALT (Figura 16-B).



**Figura 16** – (A) Curso serológico dos marcadores durante uma infeção aguda por HCV. (B) Curso serológico durante uma infeção crónica por HCV. Adaptado de Elecsys® Hepatitis testing - Powerful tools for patient oriented decision making.

## 4.2. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente responsável pelo Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pertence à família dos retrovírus.

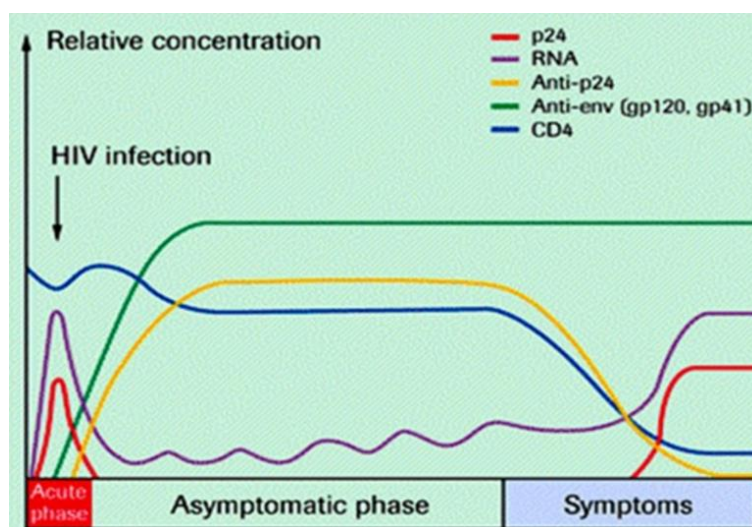
O HIV pode ser transmitido por sangue e produtos derivados do sangue contaminados, por contacto sexual ou a partir de uma mãe infetada pelo HIV ao seu filho, antes, durante e depois do nascimento.

Até ao momento, foram identificados dois tipos de HIV, denominados HIV-1 e HIV-2, apresentando cerca de 50% de homologia. A sua distribuição geográfica é diferente, o HIV-1 encontra-se por todo o mundo enquanto o HIV-2 se situa mais na África Ocidental.

Habitualmente, é possível detetar no soro anticorpos contra proteínas do HIV 6 a 12 semanas após a infeção. Em virtude da existência de diferenças ao nível da sequência de epítomos imunodominantes, especialmente ao nível da sequência do invólucro, é fundamental a recorrência a antígenos específicos. A deteção do antígeno p24 do HIV-1 em amostras de sangue de doentes infetados recentemente que apresentam carga viral elevada permite detetar o vírus cerca de 6 dias mais cedo que os testes tradicionais. Atualmente existem testes que permitem a deteção em simultâneo de anticorpos anti-HIV e antígeno p24, aumentando assim a sua sensibilidade, como é o caso do reagente utilizado no Laboratório Aeminium.

Como representado na Figura 17, após o contacto com o agente infeccioso surge a fase aguda da patologia caracterizada por elevados níveis de RNA viral que vão diminuindo com a resposta imune, antigenémia elevada, principalmente da p24, e diminuição da contagem absoluta de linfócitos T CD4. A fase assintomática, período que medeia entre a infeção primária e a imunodeficiência clínica, é caracterizada pela perda gradual de linfócitos T CD4 e os anticorpos, inicialmente ausentes, aparecem. O último estágio da doença é o SIDA que resulta na perda em número e eficácia dos linfócitos T CD4. Em média, desenvolve-se após 8-10 anos da fase assintomática. Com a progressão da doença acentuam-se os sintomas e as infeções oportunistas tornam-se cada vez mais frequentes.

No laboratório é feita uma seroteca com todas as amostras consideradas positivas para Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C e infeção por HIV, que é armazenada a cerca de -20°C enquanto houver espaço disponível.



**Figura 17** – Curso serológico da infecção por vírus da Imunodeficiência Humana. Retirado de <http://slideplayer.com/slide/5052544/>

### 4.3. Citomegalovírus (CMV)

O Citomegalovírus pertence ao género *Cytomegalovirus* e tem um genoma de DNA. O Homem é o único reservatório do CMV humano, replicando-se em vários tipos de células *in vivo* como linfócitos B, linfócitos T, linfócitos polimorfonucleares e monócitos, e acaba por estabelecer infecção latente nos leucócitos, tecido linfoide, glândulas secretórias e rins.

O CMV é tipicamente transmitido por contato próximo, por exemplo através da saliva, urina, secreções cervicovaginais e no sémen. Num hospedeiro imunocompetente, as infeções por CMV são geralmente assintomáticas bem como as reinfeções, contudo pode manifestar-se como uma síndrome de mononucleosídico com febre, mal-estar e linfadenopatia. Em hospedeiros cujo sistema imunitário é deficiente, estas infeções podem ser severas.

É necessário ter especial atenção a infeções congénitas pois podem surgir manifestações graves quando a mulher adquire a infeção primária durante a gravidez como Petéquia, Icterícia, Hepato-Esplenomegália e Microcefalia. É então importante o doseamento serológico dos anticorpos para o CMV durante a gravidez.

Para o diagnóstico são determinados anticorpos anti-CMV do tipo IgG (anti-CMV IgG) e anticorpos anti-CMV do tipo IgM (anti-CMV IgM). Um resultado negativo para anti-CMV IgM sugere que o doente não experienciou uma infeção recente, por outro lado um resultado positivo indica uma infeção recente (primária, reativação ou reinfeção). Se o resultado for positivo para anti-CMV IgG podemos estar perante uma infeção passada ou recente. Caso o

resultado seja negativo é de presumir que o indivíduo não esteve em contato com o vírus, pelo que é suscetível de adquirir uma infecção primária (Tabela 6). Podem ainda surgir resultados equívocos para anti-CMV IgM e IgG durante a infecção aguda dado que cerca de 23% das mulheres grávidas com infecção primária por CMV apenas demonstram respostas detetáveis de anti-CMV IgM passadas 8 semanas da infecção primária.

**Tabela 6** – Sumário dos possíveis resultados no diagnóstico de infecção por CMV.

<b>anti-CMV IgM</b>	<b>anti-CMV IgG</b>	<b>Interpretação</b>
Negativo	Negativo	Sem infecção recente/passada OU Sistema imune não produziu quantidade detetável de anticorpo.
Positivo	Negativo	Recente infecção primária OU Reativação OU reinfeção.
Positivo	Positivo	Infeção primária ativa OU infecção latente reativada.
Negativo	Positivo	Infeção passada OU Infecção latente.

## 5. Infeções Parasitárias

### 5.1. **Toxoplasmose**

A toxoplasmose é uma infecção comum provocada pelo parasita protozoário *Toxoplasma gondii*. A infecção é adquirida por ingestão de alimentos ou de água que está contaminada por ooquistos maduros transmitidos por gatos ou por carne mal cozinhada. A infecção aguda primária, que é geralmente ligeira ou até assintomática nos indivíduos saudáveis, é seguida de uma infecção latente que normalmente persiste durante toda a vida. Ainda assim, a reativação de uma infecção latente em pessoas imunodeprimidas (por exemplo, doentes com SIDA) está muitas vezes associada a meningoencefalite.

A infecção primária materna por *Toxoplasma gondii* durante a gravidez pode dar origem a lesões graves no feto, dado que o parasita pode ser transmitido por via placentar. A grande parte dos recém-nascidos com infecção congénita não apresentam sintomatologia, contudo podem desenvolver sequelas graves mais tarde como por exemplo atraso mental e psicomotor, hidrocefalo, coriorretinite e cegueira. A taxa de infecção fetal aumenta com a

idade gestacional, porém o risco de manifestações clínicas graves é mais elevado no caso de uma infecção materna precoce.

O diagnóstico serológico da Toxoplasmose é normalmente feito recorrendo ao doseamento dos anticorpos específicos IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii*. A determinação de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* é utilizada como indicador de infecção aguda ou latente. Por sua vez, a detecção de anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* indica uma infecção aguda, recente ou reativada (Tabela 7).

**Tabela 7** – Sumário dos possíveis resultados no diagnóstico da infecção por *Toxoplasma gondii*.

<b>IgM anti-Toxoplasma gondii</b>	<b>IgG anti-Toxoplasma gondii</b>	<b>Interpretação</b>	
Negativo	Negativo	Ausência de Infecção OU Ausência de Imunidade	→ Vigilância Serológica Trimestral
Positivo	Negativo	Início da infecção OU Presença de IgM não específica	→ 2ª colheita para confirmação
Negativo	Positivo	Imunidade OU Primo-infecção sem IgM	→ 2ª colheita para confirmação
Positivo	Positivo	Presença de Infecção	→ Teste de Avidéz

## 6. Gestão e Garantia da Qualidade

Para um bom Controlo da Qualidade existem atividades que devem ser levadas a cabo pela organização e todos os colaboradores para que seja assegurado o bom funcionamento do Laboratório.

São exemplos de princípios que estão na base do bom funcionamento do Laboratório:

- Prestar o melhor serviço, ao menor custo, com Qualidade;
- Acompanhar a evolução Científica e Tecnológica;
- Otimizar os processos produtivos maximizando a Qualidade;
- Promover o crescimento da Organização;
- Ter como objetivo sempre presente a Satisfação do Cliente;
- Implementar uma Melhoria Contínua.

### **6.1. Controlo da Qualidade Interno**

O controlo da qualidade interno é o conjunto de atividades desenvolvidas durante o processo analítico que visam garantir que a qualidade com que os resultados estão a ser produzidos é adequada ao fim a que se destinam.

Para a prática do Controlo Interno da Qualidade são utilizados soros liofilizados ou previamente reconstituídos, cujos resultados são previamente conhecidos, por forma a avaliar e corrigir, se necessário, a calibração dos analisadores.

Os controlos são realizados diariamente para todos os parâmetros de maior volume de pedidos, contudo algumas hormonas com menor número de pedidos são controladas 3 vezes por semana, sendo os testes executados nesses dias. Para cada parâmetro existem dois níveis diferentes de controlo, um nível considerado normal e um nível patológico, sendo estes níveis alternados ao longo da semana. No caso do HIV, por exemplo, usam-se 3 níveis diferentes.

Após o doseamento dos diferentes parâmetros a controlar, o equipamento faz uma representação gráfica tendo em conta a média e o desvio-padrão. Estes dados dispostos em gráfico facilitam a observação de alterações bruscas ou tendências, permitindo ao técnico aceitar ou não cada um deles.

## **6.2. Controlo Externo da Qualidade**

O Controlo Externo da Qualidade é efetuado por organismo independente externo ao laboratório, sendo um desses organismos o Instituto Ricardo Jorge. Os resultados destes controlos são, relativamente a determinados parâmetros, reunidos e tratados informaticamente no âmbito de um programa nacional de controlo de qualidade. Este câmbio de resultados analíticos permite uma comparação estatística dos nossos resultados com os de outros laboratórios nacionais que usem o mesmo método de análise para os parâmetros em causa.

## Setor da Microbiologia

A frequência e a letalidade das doenças infecciosas ao longo de milhares de anos da história humana têm sido um dos focos da ciência médica. O desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas eficazes nas últimas décadas tem diminuído, e por vezes até erradicado, algumas epidemias como a peste, varíola e outros contágios. Como resultado destes desenvolvimentos, a atenção da ciência foi desviada para outros campos.

Porém, hoje em dia são descobertos novos agentes patogênicos, previamente desconhecidos, que causam novas doenças, assim como demonstram ter capacidade de evoluir e adquirir novas patogenicidades. As origens desta reversão são muitas e complexas, por exemplo, o comportamento humano mudou, introdução de terapias médicas invasivas, negligência nos métodos de controlo de infeções, entre outras.

É, portanto, necessário que os profissionais de saúde conheçam os agentes patogênicos envolvidos e os seus mecanismos, bem como a génese da patologia.

### I. Amostras

#### I.1. **Urina**

As infeções do trato urinário são das mais comuns na população mundial, afetando na maioria as mulheres devido a terem uma uretra menor, e não possuírem fluidos prostáticos que inibem o crescimento bacteriano nos homens.

Pode haver infeções no trato urinário superior sendo a mais comum a pielonefrite que afeta o parênquima renal e no trato urinário inferior, onde predomina a cistite que afeta a bexiga.

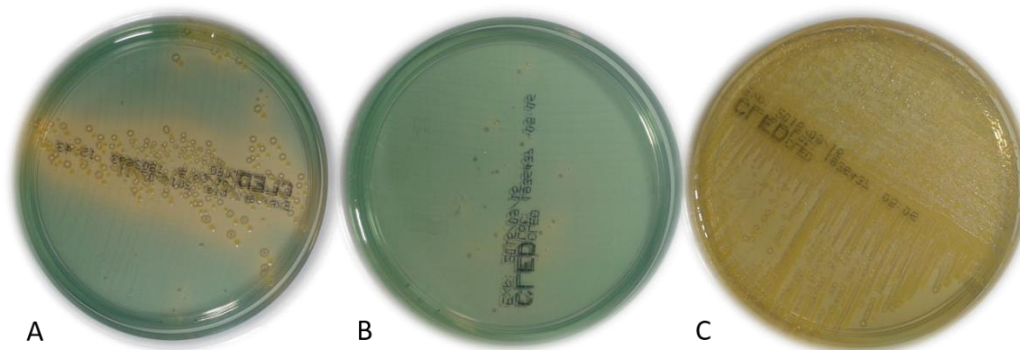
Para além dos microrganismos que compõe a flora normal da urina, os microrganismos mais comuns encontrados na urina que causam infeções são: *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, entre outras (Mahon *et al.*, 2014).

A colheita da urina para a realização da urocultura segue um procedimento. Geralmente este produto biológico é colhido pelo próprio doente, que deve recolher a primeira urina da manhã após ter feito a higiene pessoal. O utente deve iniciar a micção, rejeitando essa primeira porção, e recolher para um contentor estéril o jato intermédio da urina.



O diagnóstico laboratorial da urocultura compreende duas fases distintas. Uma delas é a análise sumária da urina que permite a detecção de determinados parâmetros químicos como proteínas, nitritos, glucose e pH. Também compõe a análise sumária da urina a análise do sedimento urinário após centrifugação, de modo a averiguar a existência de leucócitos, células epiteliais, eritrócitos, cristais e cilindros. A outra fase da urocultura consiste na sementeira num meio de cultura apropriado na câmara de fluxo laminar em condições de assepsia, tendo como objetivo quantificar os microrganismos presentes na urina. O meio de cultura semeado é o CLED (cistina, lactose, déficit em eletrólitos), utilizando uma ansa calibrada de 10 µL, sendo incubado em aerobiose, a 37°C durante 18 a 24 horas.

Após a incubação, é no meio CLED que se realiza a análise quantitativa, considerando-se positivas as amostras com um número superior ou igual a 10<sup>5</sup> UFC/mL (Figura 18). Amostras com 3 ou mais estirpes de bactérias são consideradas polimicrobianas.



**Figura 18** – (A) Urocultura em CLED negativa; (B) Urocultura em CLED negativa; (C) Urocultura em CLED positiva.

Este meio é ideal para a bacteriologia urinária em geral dado que, a deficiente concentração de eletrólitos impede o *swarming* de *Proteus* spp. no meio, a lactose incluída no meio fornece uma fonte de energia para os organismos com capacidade para utilizá-la através de um mecanismo fermentativo. Como indicador de pH para diferenciar fermentadores da lactose dos não fermentadores inclui o azul de bromotimol. Os fermentadores da lactose irão reduzir o pH e alterar a cor do meio de azul para amarelo (Mahon *et al.*, 2014).

## 1.2. Sangue

O sangue é um líquido biológico estéril pelo que, a presença de microrganismos é de valorizar. A presença de bactérias viáveis no sangue, conforme determinado através do crescimento de bactérias na cultura de sangue, é conhecida como bacteriemia. Todavia, as

culturas de sangue também podem ser positivas como resultado de contaminação do sangue durante a colheita, levando a um falso-positivo. Estas contaminações são frequentemente causadas por microrganismos comensais da pele, tais como *Staphylococcus* coagulase-negativa, por exemplo *Staphylococcus epidermidis* (Mahon et al., 2014).

Uma bacteriemia positiva é na maioria das vezes causada por bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nem sempre uma bacteriemia positiva está associada a sintomatologia pelo que a falta de evidência clínica de infecção pode trazer consequências trágicas se o diagnóstico for negligenciado e o tratamento retardado (Mahon et al., 2014).

As amostras de sangue são colhidas usando técnicas assépticas e equipamento estéril. É injetado assepticamente um máximo de 10 mL de sangue para a hemocultura e misturado o sangue com o meio de crescimento existente no frasco de hemocultura. As amostras são por fim incubadas a 37°C por um período de uma semana.

As amostras são observadas diariamente durante este período. Quando uma hemocultura é considerada positiva, é repicada para uma Gelose de Sangue de Carneiro (5%) e posteriormente identificado o microrganismo causador da bacteriemia. Uma cultura positiva é reconhecida pelo surgimento do líquido no dispositivo indicador de crescimento. Uma visualização das características do caldo é igualmente importante porque pode haver lise dos glóbulos vermelhos, turvação ou o aparecimento de colônias (Figura 19).

Após todo o período de incubação todas as hemoculturas, mesmo as que evidenciam ser negativas, são repicadas para uma Gelose de Sangue de Carneiro (5%).



**Figura 19** – (A) Hemocultura negativa; (B) Hemocultura positiva; Adaptada de <https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-oxid-signal-blood-culture-system-blood-culture-system/r65410>.

No laboratório a maioria dos pedidos de Hemoculturas dizem respeito a utentes das clínicas de diálise, uma vez que estes se encontram mais suscetíveis a este género de infecção.

### 1.3. Fezes

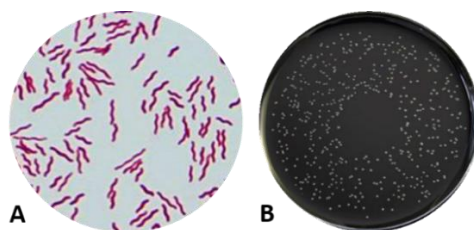
A diarreia aguda é um dos problemas mais comum avaliada por clínicos. A diarreia é definida como uma alteração do movimento normal do intestino caracterizado por um aumento no teor de água, o volume ou a frequência das fezes (Mahon *et al.*, 2014).

Embora haja exceções, a diarreia é geralmente adquirida através da ingestão de um alimento ou bebida contaminados. A maioria dos microrganismos ingeridos não alcançam o trato intestinal devido ao ambiente ácido do estômago. O pH normal gástrico é inferior a 4, pelo que mais de 99,9% das bactérias coliformes são destruídas. Contudo alguns agentes patogénicos são resistentes à ação dos ácidos gástricos, pelo que atingem o intestino delgado. O intestino delgado tem também mecanismos de defesa, nomeadamente os movimentos peristálticos que dificultam a adesão dos microrganismos à parede intestinal. Do mesmo modo, o cólon também exhibe as suas defesas através da produção local de imunoglobulina A (IgA) (Mahon *et al.*, 2014).

As bactérias que mais comumente causam diarreia são *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp., sendo estas as que são pesquisadas no exame bacteriológico que realizei.

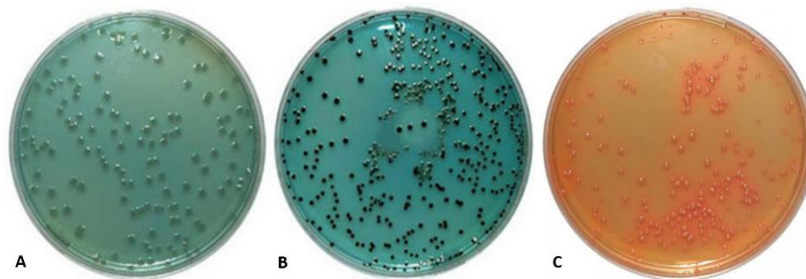
As fezes para a coprocultura (exame bacteriológico às fezes) devem ser colhidas para recipiente estéril e enviadas ao laboratório o mais rápido possível. Para o exame cultural são utilizados meios seletivos de modo a evitar o crescimento da flora normal, como o meio Hektoen e meio para isolamento de *Campylobacter* spp., e um meio de enriquecimento para aumentar o número de microrganismos a isolar, como o caldo selenito.

O meio seletivo para isolamento de *Campylobacter* spp. é um meio com cefoperazona e anfotericina B, para inibir o crescimento de outros agentes patogénicos, e é inoculado e incubado numa atmosfera microaerofílica. As colónias de *Campylobacter* spp. são cinzentas e pequenas e no exame microscópico podemos ver bacilos Gram-negativo curvos após a respetiva coloração de Gram (Figura 20).



**Figura 20** – (A) Exame microscópico onde se podem observar bacilos Gram-negativo curvos. (B) Meio seletivo onde se podem ver colónias cinzentas sugestivas de *Campylobacter* spp. Retirado e adaptado de <http://www.analisisavanzados.com/index.php/metodos-normalizados-iso> e <https://www.studyblue.com/notes/note/n/exam-3/deck/8272217>.

O meio Hektoen foi desenvolvido com o objetivo de melhorar o isolamento de microrganismos de *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. Os sais biliares presentes no meio fazem deste um meio seletivo, inibindo os microrganismos Gram-positivo e reduzindo o crescimento de alguns microrganismos Gram-negativo além das espécies de *Salmonella* e *Shigella*. A lactose, sacarose e salicina são úteis para obter uma diferenciação entre a cor das colónias e a do meio adjacente às colónias, recorrendo a indicadores de pH como fucsina ácida e azul de bromotimol que são constituintes do meio. As espécies de *Salmonella* e *Shigella* não fermentam estes compostos de carbono e, por conseguinte, não provocam uma alteração de cor. De outro modo, os microrganismos que fermentam um ou vários destes compostos em ácidos, como por exemplo *E. coli*, fazem com que a cor mude de verde para cor de laranja. O citrato de amónio férrico e o tiosulfato de sódio presentes no meio permitem a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio por *Salmonella* spp. através do aparecimento de um centro negro nas colónias. Após a inoculação do meio e da incubação durante 24 horas a 37°C deve examinar-se a placa e averiguar o grau de crescimento e o tamanho e pigmentação da colónia. As colónias de *Shigella* spp. são verdes claras e apresentam um crescimento bom a excelente. Por outro lado, as colónias de *Salmonella* spp. são colónias verdes a verde-azuladas com centro negro (Figura 21).



**Figura 21** – (A) Colónias de *Shigella* spp. em Hektoen. (B) Colónias de *Salmonella* spp. em Hektoen. (C) Colónias de *Escherichia coli* em Hektoen. Adaptado de <http://www.eolabs.com/hektoen-enteric-agar.html>.

Por fim, o caldo selenito é um meio de enriquecimento para os microrganismos patogénicos das fezes, nomeadamente *Shigella* spp. e *Salmonella* spp (Anexo 2).

## I.4. Exsudados

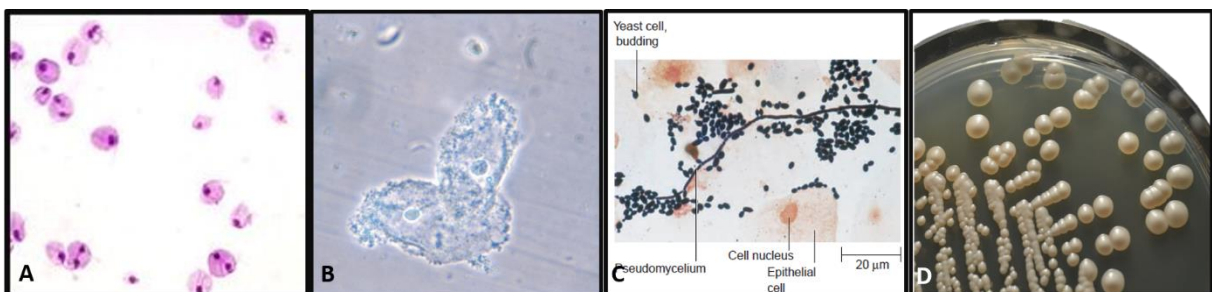
### I.4.1. Vaginal/Uretral

As infecções genitais e as infecções sexualmente transmissíveis são causadas normalmente por microrganismos presentes no trato reprodutor ou introduzidos durante o contacto sexual. Algumas das infecções mais comuns são:

- Uretrite – É uma inflamação na uretra, e pode ser causada por danos mecânicos (cateterização), irritação química (antissépticos) ou infecção. A uretrite infecciosa é usualmente associada a microrganismos que causam doenças sexualmente transmissíveis, como *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*.
- Vulvovaginite – A vaginite ocorre quando a mucosa que reveste a vagina se torna inflamada e irritada. As principais causas são bactérias, vírus ou leveduras. Os sinais típicos incluem corrimento vaginal, prurido vulvar, irritação e odor. Três patologias comumente associadas com estes sintomas são Infecção Bacteriana, Tricomoníase e Candidíase. A vaginite bacteriana ocorre quando a delicada flora normal da vagina é afetada. Microbiologicamente, a vaginite apresenta uma substituição da flora normal, com predomínio de *Lactobacillus* spp., por uma microflora mista com *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp. e *Mycoplasma hominis*. Pode também ocorrer a infecção por *S. aureus* no caso de mulheres que recorrem ao uso de tampões. A Tricomoníase é uma inflamação da mucosa vaginal por *Trichomonas vaginalis* (protozoário) (Figura 22-A). E a Candidíase é causada por *Candida albicans* (levedura) (Figura 22-C/D). As leveduras fazem parte da flora normal, contudo quando há a sua predominância passa a infecção.
- Streptococcus do Grupo B – *Streptococcus agalactiae* é normalmente inofensivo em adultos, porém pode causar doenças graves nos bebés como pneumonia e meningite se a mulher tiver uma infecção com este microrganismo durante o parto. Tendo em conta estes fatores, todas as mulheres grávidas, por voltas das 36 semanas de gestação devem fazer um exame bacteriológico para o diagnóstico de uma infecção, ou não, por esta bactéria.

Para o diagnóstico, os exsudados vaginais são colhidos com o auxílio de uma zaragatoa e posteriormente transportada ao laboratório no meio de Stuart modificado. A amostra é então semeada no meio COS (Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro), no meio PVX (Gelose Chocolate + PolyViteX) e no meio Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina. É ainda feito um exame direto a fresco entre lâmina e lamela e por fim um esfregaço numa lâmina para posteriormente corar pela técnica de Gram. No caso de exsudados uretrais é também semeado o meio VCAT (Agar Seletivo de Vancomicina, Colistina sulfato, Anfotericina B e Trimetoprim) e colocado em atmosfera de CO<sub>2</sub>, meio este que permite o crescimento de estirpes fastidiosas, como *N. gonorrhoeae*.

O meio COS é um meio de isolamento seletivo que permite o crescimento de microrganismos fastidiosos. Complementado com sangue de carneiro, é altamente nutritivo e, portanto, adaptado à cultura da maior parte das espécies bacterianas. A presença de sangue permite a determinação da hemólise, que é um critério básico para a orientação da identificação de bactérias. O meio PVX é um meio de isolamento particularmente recomendado para o crescimento de estirpes fastidiosas pertencentes ao género *Neisseria*, *Haemophilus* e *S. pneumoniae*. O meio Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina é um meio seletivo para fungos e os antibióticos que fazem parte deste inibem o crescimento de bactérias Gram- positivo e -negativo (Anexo 2).



**Figura 22** – (A) *Trichomonas vaginalis* após coloração pela técnica de May-Grunwald Giemsa. (B) *Clue cells* características de *Gardnerella vaginalis* no exame direto. (C) Leveduras características de *Candida albicans* após coloração de Gram. (D) Colónias de leveduras no meio Sabouraud.

Após a incubação dos meios a 37°C durante 24 horas é preciso avaliar as culturas para a presença ou ausência de possíveis microrganismos patogénicos. O exame a fresco é importante para se ter uma primeira informação acerca da flora que vai crescer nos meios e o que se observará na coloração de Gram e ainda é possível observar o movimento de *Trichomonas vaginalis*, no caso desta estar presente. Na coloração de Gram é possível observar leucócitos, a flora microbiana existente, células epiteliais e *clue cells* (no caso de infeção por *Gardnerella vaginalis*) (Figura 22-B).

#### I.4.2. Pús

##### i. Pele

A pele consiste em três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. A flora normal da pele consiste em microrganismos adaptados a elevadas concentrações de sal e aos efeitos secantes da pele nomeadamente, *S. epidermidis*, outros *Staphylococcus* coagulase negativa, e leveduras.

Existe uma lista muito extensiva de infeções que envolvem a pele, e a causa bacteriana é a mais comum. Os exsudados purulentos da pele podem ser adquiridos a partir de abscessos, feridas, úlceras, entre outros, com o auxílio de uma zaragatoa, sendo posteriormente semeados em COS e PVX e incubados em aerobiose a 37°C durante 24 horas e realizado um esfregaço numa lâmina para posteriormente efetuar a coloração de Gram (Anexo 2).

Na Tabela 8 estão representados os microrganismos mais comuns encontrados em infeções da pele.

**Tabela 8** – Microrganismos mais comumente encontrados em infeções da pele.

<b>Microrganismo</b>	<b>Infeção</b>
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	Feridas; Feridas crónicas; Lesões de queimaduras.
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	Feridas; Lesões de queimaduras.
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Feridas; Lesões de queimaduras; Furunculose.
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Infeções eritematosas superficiais; Abscessos; Feridas; Lesões de queimadura; Furúnculos.
<b><i>Staphylococcus spp. coagulase negativa</i></b>	Cateteres
<b><i>Streptococcus pyogenes (Grupo A)</i></b>	Infeções eritematosas superficiais; Abscessos; Feridas; Lesões de queimadura; Furúnculos; Necrose muscular.
<b><i>Streptococcus spp. beta-hemolítico</i></b>	Feridas

Após a avaliação do crescimento bacteriano nos meios sólidos deve proceder-se à Identificação e ao Teste de Suscetibilidade aos antimicrobianos em estirpes com grande probabilidade de serem agentes patogénicos e microrganismos isolados de doentes com infeções associadas a cateteres e de locais normalmente estéreis.

## ii. Auricular

A infecção auricular mais comum é a otite externa, nome dado à inflamação do canal auditivo externo, como consequência de uma infecção. Embora a enorme diversidade de causas da otite externa, a mais frequente é uma infecção causada por microrganismos proveniente do exterior. Os microrganismos que provocam o processo infeccioso são na maioria dos casos, bactérias como *P. aeruginosa* e *S. aureus*, mas também pode ser causada por fungos, normalmente por *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Embora menos comum, a pericondrite também é uma das infecções auriculares que leva à formação de pús. A pericondrite é definida como uma infecção que compromete o tecido conjuntivo que envolve a cartilagem do pavilhão auricular e canal auditivo. Nestes casos há a contaminação do local, sendo a bactéria *P. aeruginosa* a mais comumente observada nos casos de pericondrite.

Para o diagnóstico, é retirada uma amostra das secreções com o auxílio de uma zaragatoa e é enviado ao laboratório central, de modo a identificar qual o microrganismo responsável pela infecção e determinar qual o antibiótico mais eficaz. Para a cultura do produto são semeados os meios COS, PVX e Sabouraud e realizado um esfregaço numa lâmina para posterior coloração de Gram e observação ao microscópio ótico (Anexo 2).

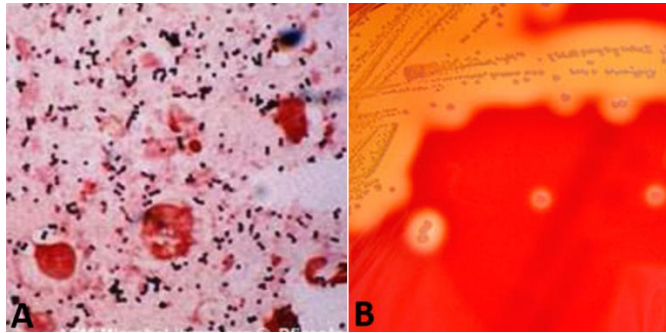
### 1.4.3. Faríngeo

As infecções das vias respiratórias superiores são muito frequentes, sendo a maioria de origem viral. O diagnóstico bacteriológico destas infecções representa uma tentativa de identificar, entre uma flora abundante, o agente implicado na patogénese (Mahon *et al.*, 2014).

Na faringite bacteriana, a principal causa é *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo A. A Faringite Estreptocócica tem com agente patogénico *Streptococcus pyogenes*. Para o diagnóstico laboratorial deve passar-se uma zaragatoa vigorosamente na zona infetada e evitar a língua e outras estruturas bocais para minimizar as contaminações com a flora oral. Para o transporte, não é necessário a utilização de meio de transporte, mas somente se o processamento ocorrer no prazo de 3 horas após a colheita. Noutras situações, deve ser utilizado o meio de Stuart. No caso de Exsudados Faríngeos para diagnóstico de Faringite Estreptocócica, o exame microscópico não tem muita importância devido à existência de



uma flora mista e de um grande número de outros *Streptococcus* na orofaringe. O exame cultural é feito recorrendo à sementeira do meio COS e VCAT. O meio COS é incubado durante 24 horas a 37°C e o aparecimento de colónias com hemólise completa do meio é um indicativo de uma possível infeção por *S. pyogenes* (Figura 23). O meio VCA é um meio seletivo para o isolamento de *N. gonorrhoeae*, estirpe que provoca, embora com menor frequência, faringite. Este meio deve ser incubado em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub> (Anexo 2).



**Figura 23** – (A) Exame direto de um exsudado faríngeo onde se pode observar uma flora abundante. (B) Exame cultural em meio COS onde se pode ver a hemólise completa do meio em torno das colónias característica de *Streptococcus pyogenes*. Adaptado e retirado de [http://microbiologiaonlineblog.blogspot.pt/2009/11/microbiologia-online-com-foco-em\\_1608.html](http://microbiologiaonlineblog.blogspot.pt/2009/11/microbiologia-online-com-foco-em_1608.html) e [https://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus\\_pyogenes](https://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_pyogenes).

#### 1.4.4. Ocular

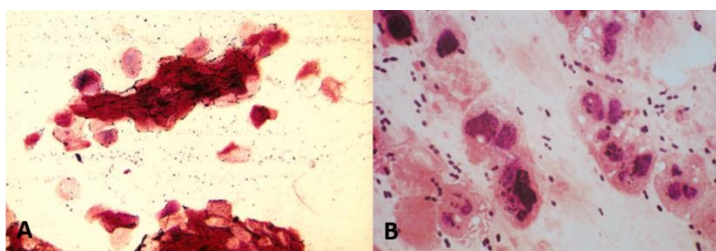
As infeções oculares podem ser divididas em infeções das estruturas externas do olho, infeções das estruturas internas do olho e infeções do sistema lacrimal. As indicações e técnicas para a colheita devem ser de acordo com a localização da infeção. Como material de colheita são utilizadas zaragatoas de algodão com ou sem meio de transporte.

Devido à constante ação de lavagem das lágrimas, o número de microrganismos isolados de algumas infeções oculares é por norma baixo, pelo que se recomenda a utilização de um grande inóculo e a sementeira de vários meios de cultura. Usualmente, semeia-se meio COS e meio PVX (Anexo 2).

A conjuntivite bacteriana representa o tipo mais frequente de infeção ocular e pode ocorrer por inoculação direta ou exógena, ou por disseminação hematogénica a partir de um foco infeccioso. Os principais agentes causadores de conjuntivite na comunidade são: *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* e *N. gonorrhoeae* (Fallis, 2013).

## 1.5. Expetoração

O sistema respiratório apresenta variados mecanismos de defesa contra as infecções, nomeadamente tosse, cílios nasais e secreções. O diagnóstico das infecções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras pela flora comensal da orofaringe durante a colheita, pelo que o laboratório apenas deve aceitar as amostras de boa qualidade (Figura 24).



**Figura 24** — (A) Ausência de leucócitos mas elevada de presença de bactérias contaminantes e células epiteliais. A amostra em questão não é uma expetoração, é saliva. (B) Expetoração aceitável para cultura onde há a presença de leucócitos e diplococos Gram-positivo. Retirado de MAHON, C. R. *et al.* - Textbook of Diagnostic Microbiology Pageburst E-book on VitalSource. Fifth Edition (2015). ISBN 0323089887.

Para o estudo de infeções do trato respiratório há uma grande variabilidade de amostras, todavia a expetoração é a mais frequente. Para a colheita da expetoração, se possível, deve ser colhida a primeira expetoração da manhã, a expetoração deve colhida através de tosse profunda e a amostra é colocada num recipiente estéril, seco, de boca larga e tampa de rosca.

Quando as amostras chegam ao laboratório, estas devem ser observadas ao microscópio após coloração de Gram de modo a definir a boa qualidade da mesma com base no número de leucócitos e células epiteliais. Após este passo fundamental segue-se o exame cultural, onde a porção purulenta é semeada em meio COS, PVX e Sabouraud e incubada em aerobiose a 37°C durante 24 horas. Os microrganismos causadores destas infeções são diversos e variam consoante as idades (Tabela 9) (Anexo 2).

**Tabela 9** – Microrganismos patogênicos mais comuns em infecções do trato respiratório inferior consoante as idades. Retirado de MAHON, C. R. *et al.* - Textbook of Diagnostic Microbiology Pageburst E-book on VitalSource. Fifth Edition (2015). ISBN 0323089887.

<b>Idade</b>	<b>Causa</b>
<b>Recém-nascidos</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<b>Crianças</b>	
Crianças	Vírus sinciciais respiratórios; Vírus Influenza.
5-18 meses	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Haemophilus influenzae</i> .
3 meses a 19 anos	Vírus; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
Adultos	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ; <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Legionella</i> spp.
Adultos institucionalizados	Bacilos Gram-negativo; <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> .

## 1.6. Esperma

A spermocultura pode elucidar a presença de infecções nas glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino, como uma prostatite, prostovesiculite, etc. Este exame deve ser indicado na presença de sinais e sintomas de infecção das glândulas acessórias ou, quando houver, presença de piospermia ou aumento de leucócitos na urina. Para a spermocultura não há necessidade de abstinência sexual, a colheita de esperma deve ser efetuada em boas condições de higiene pessoal e para um frasco coletor esterilizado.

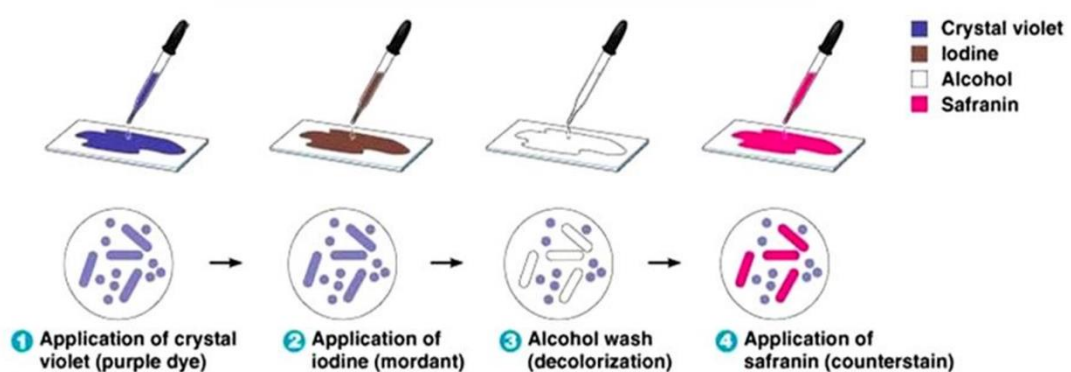
O resultado deve ser interpretado de modo geral, levando-se em conta o microrganismo isolado, a contagem bacteriana, a presença de leucócitos e eritrócitos. Este exame inclui a pesquisa de diversos agentes em meios especiais de cultura, incluindo de *N. gonorrhoeae* e *G. vaginalis*. De modo geral, são associados a doença, além dos agentes patogênicos já citados, os microrganismos *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Enterococcus* spp., e mais raramente *S. aureus*. Para a identificação do microrganismo possível causador da infecção é semeado meio COS e PVX colocado em aerofilia e o meio VCAT em atmosfera de CO<sub>2</sub> para pesquisa da *N. gonorrhoeae* (Anexo 2).

## 2. Provas de Identificação

### 2.1. Técnica de Coloração de Gram

A Coloração de Gram é um método de coloração de bactérias, o qual permite distinguir bactérias com base na estrutura da parede celular. O método é baseado no facto da parede celular de bactérias Gram-positivo conseguirem reter o corante cristal violeta no citoplasma durante a aplicação do diferenciador dado que têm uma camada espessa de peptidoglicano, ao contrário da parede celular de bactérias Gram-negativo, que não possuem essa capacidade por terem uma fina camada de peptidoglicano e uma quantidade elevada de lípidos na membrana externa.

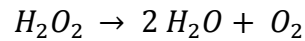
Para efetuar o protocolo primeiro é necessário preparar um esfregaço bacteriano. Depois cobre-se o esfregaço com Violeta de Genciana durante cerca de 1 minuto e lava-se com água. De seguida cobre-se o esfregaço com Soluta de Lugol deixando atuar também durante 1 minuto, lavando-se seguidamente com água. O passo que se segue consiste em deixar cair gota a gota Álcool-Acetona e lavar imediatamente com água. Por fim, o último corante a ser aplicado é a Fucsina de Ziehl diluída deixando atuar por 30 segundos e lavando com água (Figura 25). Depois visualiza-se ao microscópio onde as bactérias Gram-positivo ficam coradas de roxo e as bactérias de Gram-negativo ficam coradas de rosa.



**Figura 25** – Procedimento da coloração de Gram onde pode ser observado que bactérias Gram-positivo ficam coradas de roxo e bactérias Gram-negativo ficam coradas de rosa. Adaptado de <http://slideplayer.com.br/slide/288938/>

## 2.2. Teste da Catalase

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos microrganismos que decompõe o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) segundo a seguinte reação química:



O teste da catalase é usado em microbiologia com o intuito de distinguir entre *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., dado que *Staphylococcus* spp. são catalase positiva, ao contrário de *Streptococcus* spp. Para proceder a este teste coloca-se uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina de microscópio e com o auxílio de uma ansa é recolhida uma colónia, sendo esta esfregada na gota. Se houver libertação de oxigénio, isto é, formação de bolhas, então o organismo é catalase-positivo. Por outro lado, a ausência de bolhas demonstra que o organismo é catalase-negativo. Este teste é essencial para a escolha do antibiograma a ser utilizado no Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) como veremos mais à frente.

## 2.3. Teste da Oxidase

O teste da oxidase determina a presença do sistema citocromo oxidase que irá oxidar o citocromo reduzido com oxigénio. Este teste é útil na diferenciação entre Enterobactérias, que são oxidase-negativa e *Pseudomonas* spp. que pelo contrário são oxidase-positiva.

O procedimento para este teste consiste em colocar algumas gotas de tetrametil-p-fenilenediamina em cima de papel de filtro e com uma ansa (não metálica) retirar uma colónia e coloca-la sobre o papel. As colónias que contenham a enzima desenvolvem uma cor roxa em cerca de 10 segundos.

## 2.4. Teste da Urease

O teste da urease determina se um microrganismo consegue hidrolisar ureia, libertando uma grande quantidade de amónia capaz de provocar uma mudança de cor do meio. A urease hidrolisa a ureia, formando amónia e  $CO_2$ , que vão por sua vez originar carbonato de amónia, que provoca um aumento do pH.

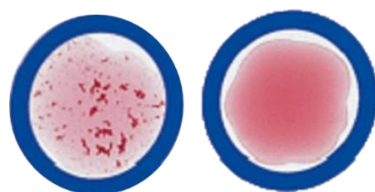
Para este teste é usado um meio ureia-indol onde o aparecimento de uma cor vermelho-rósea é considerado um teste positivo dado que o aumento do pH provoca a alteração do meio de amarelo para vermelho-rósea. As espécies de *Proteus* hidrolisam rapidamente a ureia; por sua vez *E. coli* não produz urease.

## 2.5. Teste da Coagulase (Pastorex™ STAPH-plus)

O Pastorex STAPH-plus é um kit rápido baseado num teste de aglutinação para a deteção simultânea do fator de afinidade ao fibrinogénio, proteína A e polissacarídeos capsulares presentes em *S. aureus*.

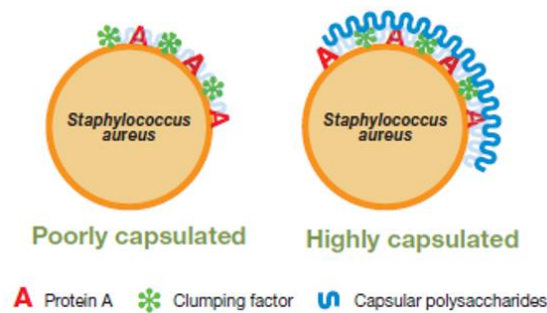
*S. aureus* é um dos agentes patogénicos mais frequentemente encontrado em amostras clínicas, pelo que uma distinção rápida entre esta espécie e as outras é muito importante. Para este teste foram desenvolvidos reagentes de aglutinação que permitem uma deteção mais rápida e mais fiável de *S. aureus*. Estes testes de aglutinação são constituídos por látex sensibilizado por fibrinogénio e IgG, a fim de detetar o fator de afinidade por fibrinogénio e proteína A, que são proteínas características de *S. aureus*.

Regista-se uma reação positiva quando se observa formação de agregados unicamente com o látex de teste, visíveis a olho nu em menos de 30 segundos. Em caso de reação negativa, a suspensão não apresenta agregados e mantém o seu aspeto leitoso (Figura 26).



**Figura 26** – A reação da esquerda representa uma reação positiva onde se pode observar a formação de agregados. Na reação da direita, a suspensão não apresenta agregados, pelo que é negativa. Retirado de Pastorex STAPH Plus – Direct Identification Visibly Reliable.

Contudo, tem-se verificado que certas estirpes de *S. aureus* não sofrem aglutinação por possuírem todos os polissacarídeos capsulares que acabam por dissimular a proteína A e o fator de afinidade para o fibrinogénio, impedindo a aglutinação de partículas de látex (Figura 27).



**Figura 27** – Diferenças entre estirpes de *Staphylococcus aureus* altamente capsuladas que impedem a aglutinação e é dado um resultado falso-negativo e estirpes de *Staphylococcus aureus* pouco capsuladas. Retirado de Pastorex STAPH Plus – Direct Identification Visibly Reliable.

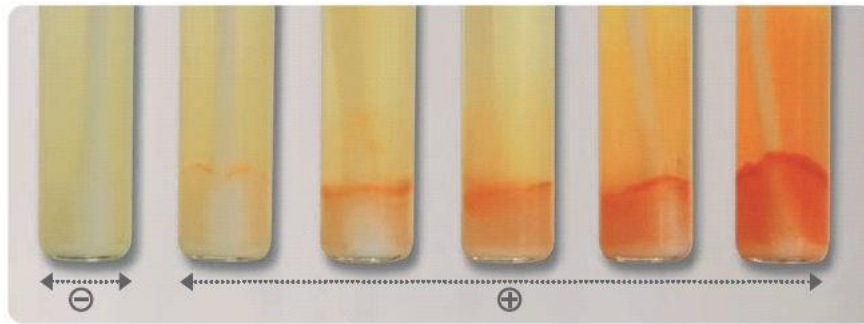
## 2.6. Teste de Identificação dos Grupos de Lancefield em *Streptococcus* spp. (PathoDXTRA Strep Grouping KIT)

*Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos podem ser diferenciados nos Grupos de Lancefield baseado nos antígenos hidrocarbonados específicos. Esta diferenciação é necessária para o tratamento clínico e fins epidemiológicos. Este teste usa o método da aglutinação em látex em que anticorpos específicos das partículas de látex reagem, e aglutinam, com os antígenos específicos do respetivo grupo de *Streptococcus* extraídos previamente da parede celular das bactérias. Na presença do antígeno correspondente, as partículas de látex formam um padrão granular, contrastando com a aparência leitosa e uniforme de um teste negativo.

Para este teste são utilizados reagentes de extração e neutralização para que os antígenos específicos de cada grupo de *Streptococcus* estejam disponíveis para a possível aglutinação. Por fim é utilizado um reagente correspondente ao grupo de Lancefield que queremos testar, isto é, caso seja usado o reagente para detetar *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos do Grupo B e haja a formação de aglutinação, então estamos perante um *Streptococcus* do Grupo B.

## 2.7. Caldo Granada difásico

O Caldo Granada difásico é um meio específico, sensível, simples e rápido usado para a deteção de *Streptococcus* do grupo B. Este caldo utiliza a deteção de Granadaene, um pigmento vermelho poliénico (Figura 28), para diferenciar *Streptococcus* do grupo B de outras bactérias patogénicas e inibe a maioria dos microrganismos que não pertencem às espécies de *S. agalactiae*.



**Figura 28** – Conjunto de resultados após 18 horas de incubação, onde o aparecimento de coloração laranja-vermelho é considerado positivo. A ausência de pigmentação laranja é considerada um teste negativo. Retirado de [http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG\\_CLN\\_PRD&doc=PTG\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_217&pubparams.sform=4&lang=pt](http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_217&pubparams.sform=4&lang=pt)

*S. agalactiae*, quando provoca infecção na gravidez, pode conduzir a lesões graves para o recém-nascido, pelo que este teste é utilizado como rastreio em todas as mulheres grávidas às 35-37 semanas de gestação.

## 2.8. Cartas de Identificação para Vitek® 2 Compact

Para a identificação dos microrganismos isolados das amostras processadas são utilizadas cartas de identificação para o Vitek® 2 Compact da BioMérieux™.

Previamente deve ser observado o exame direto, através da coloração de Gram, o exame a fresco e provas de identificação, sendo de seguida realizada a identificação pelas cartas correspondentes.

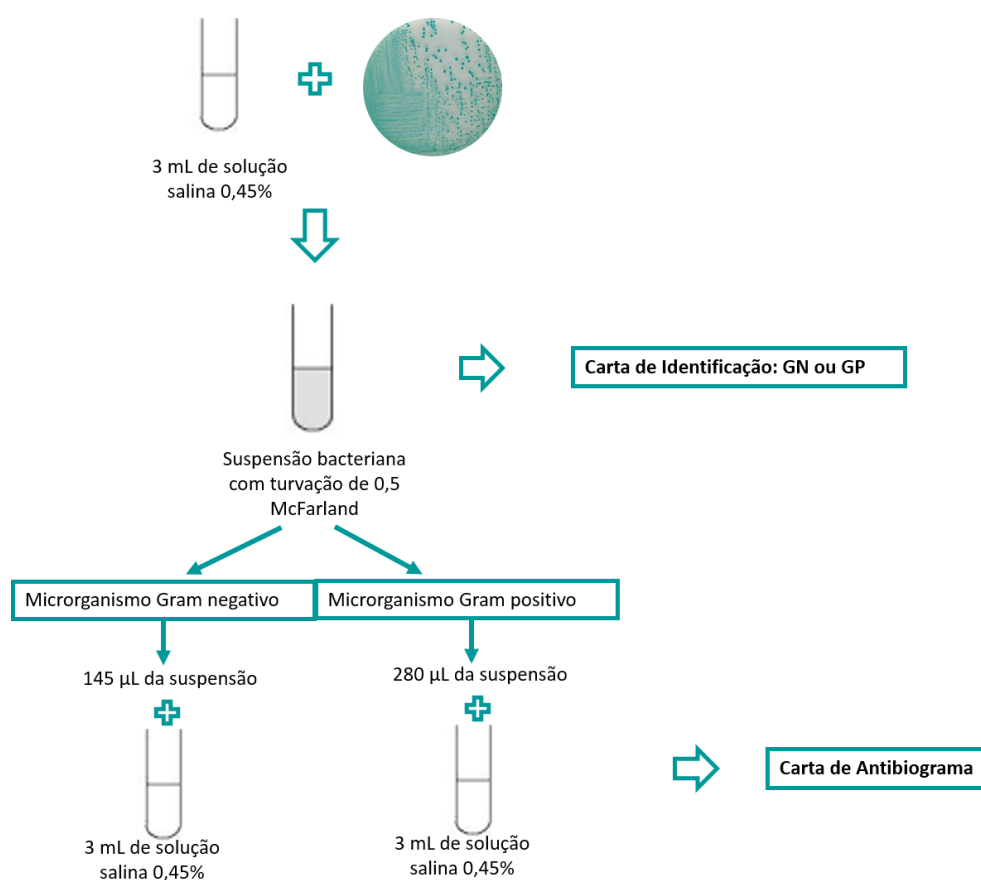
No laboratório são usadas duas cartas de identificação: GN para microrganismos de Gram-negativo e GP para microrganismos de Gram-positivo. Estas cartas têm 64 poços com hidratos de carbono e enzimas que permitem a identificação dos microrganismos com mais exatidão, contém um tubo de transferência pré-inserido, diminuindo as etapas manuais e um código de barras singular que garante a qualidade e a completa rastreabilidade. Para isso deve ser feita uma suspensão em NaCl 0,45% com uma turvação de cerca de 0,5 McFarland de colónias com um máximo de 48 horas.



### 3. Provas de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Para ser eficaz, um tratamento com um antimicrobiano deve ter em conta a sensibilidade aos antimicrobianos por parte dos microrganismos em causa. A Prova de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, vulgarmente chamada de antibiograma, tem por objetivo medir essa sensibilidade.

Tendo em conta a rapidez com que se desenvolvem as bactérias resistentes, este teste é indispensável. Hoje em dia, a maioria dos laboratórios utilizam equipamentos automatizados que fazem a inoculação nos poços que contêm os antibióticos em diferentes concentrações. Após algumas horas de inoculação, o crescimento bacteriano é calculado por turbidimetria sendo os resultados explorados e comentados por um sistema informático. A estirpe bacteriana pode ser definida como sensível, intermédia ou resistente. Uma estirpe sensível é uma estirpe que pode ser atacada por um tratamento com doses habituais por via geral, uma estirpe intermédia é uma estirpe que pode ser atacada por um tratamento local ou um aumento das doses por via geral, e por fim, uma estirpe resistente é uma estirpe que não responde ao antibiótico, qualquer se seja o tipo de tratamento e a posologia utilizada.



**Figura 29** – Procedimento para a Identificação e Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos utilizado para o equipamento Vitek® 2 Compact.

Após a prévia identificação do microrganismo, é escolhida a carta respetiva para efetuar o antibiograma. Para se proceder a estes testes é feita uma suspensão de 0,5 McFarland em 3mL de Solução Salina 0.45% para as cartas de identificação, como referido acima. Para o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é também feita uma suspensão em 3 mL de Solução Salina 0,45%. No caso de um microrganismo Gram-negativo são transferidos 145 µL da suspensão inicial para estes 3 mL da Solução Salina. Por outro lado, no caso de microrganismos Gram-positivo são transferidos 280 µL (Figura 29).

Na Tabela 10, estão indicadas quais as cartas de identificação e o respetivo antibiograma que devem ser utilizados consoante o microrganismo que provoca a infeção.

**Tabela 10** – Carta de Identificação e Antibiograma usados para determinados microrganismos.

<b>Gram</b>	<b>Carta de Identificação</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Antibiograma</b>
<b>Positivo</b>	GP	<i>Staphylococcus</i> spp.	P619
		<i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus agalactiae</i>	P586
		<i>Streptococcus</i> spp.	ATB Strep
<b>Negativo</b>	GN	<i>Enterobacteriaceae</i>	N244
		Oxidase Positiva ( <i>Pseudomonas</i> spp.) e <i>Acinetobacter</i> spp.	N222

#### 4. Controlo da Qualidade

O Controlo de Qualidade Interno é realizado mensalmente, a partir de estirpes ATCC de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* que se encontram viáveis, liofilizadas e estabilizadas, sendo pré-embaladas e prontas a usar. Estas estirpes são previamente semeadas em meio COS, sendo depois feito o Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, comparando-se os resultados obtidos.

Além disso, as temperaturas de todos os frigoríficos e estufas são também verificados e controlados trimestralmente.

Anualmente é feito um ensaio de controlo de qualidade externo, do LabQuality através do Instituto Ricardo Jorge.

## Conclusão

O Técnico de Análises Clínicas deverá ser um profissional com conhecimentos científicos, e capacidades técnicas com os utentes, desde as colheitas, preparação e processamento das amostras biológicas. São estes, entre outros, os padrões de qualidade e princípios éticos que me foram transmitidos por todos os profissionais com quem contactei durante o estágio. O Técnico de Análises Clínicas é um dos componentes essencial para a saúde da comunidade tendo como papel contribuir com o melhor de si e do seu trabalho para o bem comum de todos.

Estar em contacto com um serviço deste nível permitiu-me ter a noção de como se aplicam todos os conhecimentos lecionados durante as aulas do Mestrado em Análises Clínicas e como se trabalha sempre primando pela qualidade. Para além da consolidação dos conhecimentos adquiridos, o estágio foi enriquecedor no sentido de entender toda a complexidade que está envolvida na gestão do laboratório e de todos os reagentes e material que é necessário para manter o funcionamento de todos os equipamentos.

Em conclusão, este estágio foi muito enriquecedor e construtivo, e todo o conhecimento que me foi transmitido irá ser muito vantajoso na vida profissional que se avizinha.



## Referências

- ADHYAM, M.; GUPTA, A. K. - A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. **Indian Journal of Surgical Oncology**. ISSN 09757651. 3:2 (2012) 120–129. doi: 10.1007/s13193-012-0142-6.
- AMAYO, A. A.; KURIA, J. G. - Clinical application of tumour markers: a review. **East African medical journal**. . ISSN 0012835X. 86:12 Suppl (2009) 76–83.
- BETHEA, M.; FORMAN, D. T. -  $\beta$ 2-Microglobulin: Its significance and clinical usefulness. **Annals of Clinical and Laboratory Science**. . ISSN 00917370. 20:3 (1990) 163–168.
- BRENT, Gregory A. - Science in medicine Mechanisms of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**. 122:9 (2012) 3035–3043. doi: 10.1172/JCI60047.three.
- COOPER, D. S. *et al.* - Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid**. . ISSN 1050-7256. 19:11 (2009) 1167–1214. doi: 10.1089/thy.2009.0110.
- COUSSY, F. *et al.* - Interest of CA 125 level in management of ovarian cancer. **Gynecologie Obstetrique Fertilite**. . ISSN 12979589. 39:5 (2011) 296–301. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.10.018.
- COX, K. L. - Immunoassay Development, Optimization and Validation Flow Chart. **ImmunoAssay Methods**. (2011).
- EDWARD R. A., David E. B. B. C. A. - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Fifth Edition (2012). ISBN 9781416061649.
- FALLIS, A. . - Microbiology A Human Perspective. **Journal of Chemical Information and Modeling**. . ISSN 1098-6596. 53:9 (2013) 1689–1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. - Immunobiology and Pathogenesis of Viral Hepatitis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. ISSN 1553-4006. 1:1 (2006) 23–61. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230.
- KELLY, G. - Peripheral metabolism of thyroid hormones: A review. **Alternative Medicine Review**. ISSN 10895159. 5:4 (2000) 306–333.
- MAHON, C. R. *et al.* - **Textbook of Diagnostic Microbiology Pageburst E-book on VitalSource**. Fifth Edition (2015). ISBN 0323089887.
- MALATI, T. - Tumour markers: An overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. .

ISSN 09701915. 22:2 (2007) 17–31. doi: 10.1007/BF02913308.

MATHENY, Samuel C.; KINGERY, Joe E. - Hepatitis A. **American Family Physician**. . ISSN 0002838X. 86:11 (2012) 1027–1034.

MEDEIROS, L. R. *et al.* - Accuracy of CA 125 in the diagnosis of ovarian tumors: A quantitative systematic review. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**. ISSN 03012115. 142:2 (2009) 99–105. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.08.011.

MODI, A. A.; LIANG, T. J. - Hepatitis C: A clinical review. **Oral Diseases**. ISSN 1354523X. 14:1 (2008) 10–14. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01419.x.

PERKINS, G. L. *et al.* - Serum tumor markers. **American Family Physician**. 68 (2003) 1075–1082.

PITTMAN, C. S.; PITTMAN, J. A. - A Study of the Thyroglobulin, Thyroidal Protease and Iodoproteins Thyroidal in Two Congenital. *Clinical Reaserched* 40 (1966).

TRÉPO, C. *et al.* - Hepatitis B virus infection. **The New England Journal of Medicine**. (2014) 2053–2063. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60220-8.

WHITLEY, R. J.; AIN, K. B. - Thyroglobulin: A specific serum marker for the management of thyroid carcinoma. **Clinics in Laboratory Medicine**. ISSN 02722712. 24:1 (2004) 29–47. doi: 10.1016/j.cll.2004.01.001.

## Anexos

- **Anexo I** – Marcadores serológicos da Hepatite B.

	Vírus infecciosos	AgHBs	AgHBe	Anti-HBs	Anti- HBe	Anti- HBc IgM	Anti- HBc IgG
Hepatite B aguda	+	+	+	-	-	+	+
Hepatite B crónica	+	+	+/-	-	-/+	+/-	+++
Infeção no passado recente	-	-	-	++	+/-	-	++
Infeção no passado distante	-	-	-	+/-	-	-	+/-
Vacinação recente	-	-	-	++	-	-	-





- **Anexo 2** – Procedimentos em microbiologia consoante o produto.

PRODUTOS	PROCEDIMENTOS	CONDIÇÕES ESPECIAIS
Exsudado Vaginal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose de Chocolate (PVX);</li> <li>• Gelose de Sabouraud.</li> </ul>	
Exsudado uretral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose VCAT;</li> <li>• Gelose de Sabouraud.</li> </ul>	COS + VCA colocar em atmosfera CO <sub>2</sub>
Exsudado Purulento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose de Chocolate (PVX).</li> </ul>	
Exsudado Auricular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose de Chocolate (PVX);</li> <li>• Gelose de Sabouraud.</li> </ul>	
Exsudado Faríngeo/Nasal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose de Chocolate (PVX).</li> </ul>	
Expetoração	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose de Chocolate (PVX);</li> <li>• Gelose de Sabouraud.</li> </ul>	
Fezes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caldo Selenito (suspender com uma ansa um pouco do produto);</li> <li>• Meio Hektoen (a partir da suspensão do caldo selenito);</li> <li>• Meio CCDA (a partir da suspensão do caldo selenito).</li> </ul>	Meio CCDA em atmosfera microaerofílica.
Espermocultura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose de Chocolate (PVX).</li> </ul>	Se pedir a pesquisa de <i>N. gonorrhoeae</i> semear também VCAT e colocar em atmosfera de CO <sub>2</sub> .
Pesquisa de <i>Streptococcus</i> do Grupo B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frasco Granada;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS).</li> </ul>	
Ocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas para coloração de Gram;</li> <li>• Gelose de Sangue (COS);</li> <li>• Gelose de Chocolate (PVX).</li> </ul>	