



Flávio Sulemane Pinho Alves

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Cristiana Canha e pela Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Flávio Sulemane Pinho Alves

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Dra. Cristiana Canha e pela Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Após o final de uma jornada de 5 anos, sinto que é necessário agradecer a todas as pessoas que me ajudaram neste percurso, especialmente nestes últimos dois anos de mestrado.

Agradeço à Professora Doutora Leonor Martins de Almeida, por se ter mostrado sempre disponível a ajudar, em qualquer momento.

Agradeço à Dr.^a Cristiana Canha por me ter recebido de braços abertos no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e cujo o seu alto nível de exigência me permitiu crescer, não só enquanto profissional de saúde, preparando-me para as exigências do mercado de trabalho, mas também enquanto pessoa.

No mesmo sentido, quero agradecer também à Dr.^a Alice Mendes, por me ter ajudado, de igual forma, sempre que precisei.

Agradeço, ainda, à Professora Doutora Paula Cristina Luxo Maia pela atenção, disponibilidade e orientação prestadas.

A estes agradecimentos devo acrescentar ainda um pedido de desculpa ao meu irmão, Henrique Alves, pela minha ausência durante todos estes anos de faculdade, agradecendo-lhe a paciência. Espero um dia poder vir a recompensá-lo.

Agradeço à minha namorada, Carla Pedrosa, por ter feito de mim uma pessoa mais responsável, por não me ter deixado fugir dos meus problemas, por me ter encorajado e ajudado a ultrapassar os diversos obstáculos.

Por fim, agradeço à minha mãe, que diariamente, desde o início, tem lutado e trabalhado por mim, de modo a eu poder alcançar os meus sonhos. É a pessoa de quem mais me orgulho e a que sinto que nunca poderei retribuir todo o esforço e trabalho. À pessoa que sempre me apoiou, me ajudou e nunca me abandonou: obrigado, mãe, por tudo!

Índice

Introdução.....	1
Caracterização do local de estágio	2
Imunologia.....	3
Introdução	3
Metodologias e equipamentos utilizados	3
Estudo das proteínas do soro.....	8
Estudo das proteínas da urina.....	15
Determinação da IgE específica	17
Crioglobulinas.....	21
Principais doenças imunoproliferativas.....	23
Microbiologia.....	29
Introdução	29
Aparelhos automatizados	29
Amostras.....	33
Meios de cultura	41
Testes de susceptibilidade antimicrobiana (TSA).....	46
Micobactérias.....	48
Micologia.....	51
Parasitologia	53
Conclusão	57
Referências bibliográficas.....	59

Abreviaturas

ATCC – American Type Culture Collection

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CLSI – The Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração mínima inibitória

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEIA – Fluorescence enzyme immunoassay

GS – Gelose de Sangue

Ig – Imunoglobulina

Igs – Imunoglobulinas

IL – Interleucina

INSA – Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LLC – Leucemia linfocítica crónica

MGUS – Gamapatia monoclonal de significado indeterminado

MM – Mieloma múltiplo

PMN – Polimorfonuclear

PVX – PoliViteX

SNC – Sistema nervoso central

SPC – Serviço de Patologia Clínica

TSA – Testes de suscetibilidade antimicrobiana

VHB – Vírus da hepatite B

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

Resumo

O presente relatório tem por objetivo descrever a experiência de estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, estágio esse realizado sob orientação da Dr.^a Cristiana Canha e com colaboração da Dr.^a Alice Mendes.

O estágio abrangeu os sectores de Microbiologia, Imunologia, Hematologia e Bioquímica, tendo tido local no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. O estágio teve a duração de 6 meses (janeiro 2018 – junho 2018) e o respetivo relatório de estágio incidirá nas valências de Microbiologia e Imunologia.

Estruturalmente, o presente relatório inicia-se com uma introdução ao laboratório de análises clínicas, seguida da caracterização do local de estágio principal, bem como uma descrição da experiência adquirida durante o decurso do mesmo. De seguida, encontra-se um enquadramento teórico das metodologias, tecnologias e procedimentos presenciados nos sectores correspondentes às duas valências inicialmente escolhidas.

Palavras-chave: CHUC, Patologia clínica, Análises clínicas, Microbiologia, Imunologia.

Abstract

This report aims to describe the curricular internship experience of the Master's Degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, an internship that was conducted under the guidance of Dr. Cristiana Canha and the collaboration of Dr. Alice Mendes.

The internship comprised the areas of Microbiology, Immunology, Hematology and Biochemistry, and was conducted in the Clinical Pathology Department of the *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*. The internship lasted 6 months (January 2018 – June 2018) and the respective internship report will focus on the areas of Microbiology and Immunology.

Structurally, this report begins with an introduction to the clinical laboratory, followed by the characterization of the location of the internship, as well as a description of the experience gained during the internship. Up next comes a theoretical framework of the methodologies, technologies and procedures experienced in the sectors corresponding to the two areas initially chosen.

Keywords: CHUC, Clinical pathology, Clinical analysis, Microbiology, Immunology.

Introdução

O presente relatório de estágio pretende descrever o estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas decorrido no Edifício São Jerónimo, pertencente ao Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). O estágio foi dividido de igual forma entre os quatro sectores principais do laboratório: Microbiologia, Imunologia, Bioquímica e Hematologia. O estágio decorreu também no Laboratório de Citometria de Fluxo e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pediátrico. Como inicialmente foram escolhidas como valências principais Microbiologia e Imunologia, serão essas as áreas desenvolvidas neste relatório.

O laboratório de patologia clínica consiste num dos alicerces da medicina moderna, sendo necessário para proceder à maioria dos diagnósticos clínicos. Cada um destes diagnósticos são suportados por inúmeros métodos laboratoriais, cada um com as suas idiosincrasias, com as suas vantagens e desvantagens, mas cada um com a sua utilidade.

Este estágio curricular foi de extrema importância. Estar em contacto directo com as diferentes patologias, com as mais diversas amostras, com os equipamentos e metodologias foi essencial para a minha formação como profissional de saúde. Além do mais, o estágio serviu para cimentar todo o conhecimento teórico adquirido, não apenas ao longo dos dois anos de mestrado, mas também o conhecimento adquirido durante a licenciatura. Ao longo do tempo fui ganhando confiança no laboratório e neste momento posso, sem dúvida, dizer que estou apto para trabalhar num laboratório de análises clínicas.

Caracterização do local de estágio

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) é composto por três polos, tendo o estágio decorrido em dois deles: o Edifício São Jerónimo e o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pediátrico. O SPC engloba vários laboratórios e vários sectores: Imunologia, Auto-imunidade, Serologia, Bioquímica (rotina, urgência, tratamento de urinas), Hematologia (coagulação, observação de lâminas), Hormonologia, Microbiologia (bacteriologia, parasitologia, micologia, micobacteriologia). Outras áreas incluem as da receção de amostras biológicas, salas de validação de resultados, e salas de microscópios, distribuídas por entre os vários sectores.

Relativamente à equipa que constitui o laboratório, esta é constituída por médicos patologistas clínicos, técnicos superiores de saúde e técnicos de diagnóstico e terapêutica, bem como técnicos administrativos e auxiliares.

O laboratório possui uma sala de colheitas, que atende diariamente mais de 400 doentes, recebendo amostras de sangue, urina, expetorações, entre outros. Está implementado um sistema de prioridade de doentes, sendo que os transplantados, diabéticos e doentes em consultas de oncologia são atendidos em primeiro lugar. Os tubos e contentores com as variadas amostras são identificados com um código de barras, consistindo num código numérico, precedido por uma letra, que identifica o sector ao qual a amostra se destina. Segundo as especificações do pedido de análise pelo clínico, sabe-se qual a amostra, o contentor e o procedimento de colheita.

O laboratório também recebe amostras de várias enfermarias do centro hospitalar, bem como de outros hospitais, como o Hospital de Castelo Branco e o Hospital de Aveiro. Esta receção por parte do SPC justifica-se pelo facto daqueles hospitais terem um reduzido número de pedidos, o que não justifica a implementação da análise, pelo que esta é assim realizada em Coimbra. Isto não invalida, no entanto, que o próprio SPC envie amostras para outros locais, como o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

O laboratório encontra-se ligado por um sistema de gestão de informação clínica e médica, designado por *Clinidata XXI*, que permite a integração dos pedidos de análise, a visualização da história clínica do doente, a produção e impressão de listas de trabalho, a validação dos resultados de análises já efetuadas e a visualização de estatísticas. Existe também outro sistema informático no laboratório, o *Hemagest*, específico do sector de Hematologia, encontrando-se integrado no sistema *Clinidata XXI*.

Imunologia

I. Introdução

A imunologia consiste no estudo dos componentes do organismo humano responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de antígenos estranhos, bem como o modo como estes componentes reagem e interagem, as consequências dessas interações e ainda as formas como o sistema imunitário pode ser manipulado para a proteção e tratamento de doenças.

Este sistema é composto por várias linhas de defesa: a primeira é constituída por barreiras físicas, como a pele; a segunda pelo sistema imunitário inato, um mecanismo de defesa não-específico; a terceira pelo sistema imunitário adquirido, permitindo uma resposta personalizada contra os diferentes tipos de microrganismos.

Tanto o sistema imunitário inato como o adquirido são compostos por duas partes: uma parte celular, composta por células como macrófagos (inato) e linfócitos (adquirido), e uma parte humoral, constituída pelo sistema do complemento (inato) e pelos anticorpos (adquirido).

Neste sector são processadas amostras de urina de 24h, fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR), soro e plasma heparinizado. Neste sector existem os equipamentos BN ProSpect, para a realização de ensaios nefelométricos, Hydrasis, para a realização de electroforese e imunofixação, e ImmunoCap, para a pesquisa da IgE específica.

2. Metodologias e equipamentos utilizados

2.1. Imunodifusão radial

A imunodifusão radial consiste num método relativamente arcaico que tem vindo a ser substituído na maior parte dos laboratórios. Nesta técnica, o anticorpo é uniformemente distribuído num gel de suporte, e o antígeno é aplicado num poço cortado nesse gel. À medida que o antígeno se difunde a partir do poço, há uma combinação entre antígeno e anticorpo até que seja atingida a zona de equivalência, levando à formação de uma matriz estável no gel. A área da zona obtida é a medida da concentração de antígeno, e esta pode ser comparada com uma curva padrão, obtida usando antígenos de concentrações conhecidas (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Existem duas técnicas para a medição da imunodifusão radial. A primeira designa-se por método “*end-point*”. Nesta técnica o antígeno difunde na sua totalidade, e quando é atingida a zona de equivalência, não ocorrem mais mudanças no diâmetro do anel. O inconveniente desta técnica é que demora entre 24h a 72h. A segunda técnica, aquela que é

usada no laboratório, designa-se por método cinético, que utiliza dados provenientes de medições realizadas antes de ser atingida a zona de equivalência. Neste caso, o diâmetro da área é proporcional ao logaritmo da concentração e a leitura da técnica é feita 24h depois. Em qualquer uma das técnicas devem ser usados anti-soros monoespecíficos com uma afinidade bastante elevada para aumentar a claridade da reação de precipitação.

A imunodifusão radial consiste numa técnica fácil de executar e que não requer instrumentação. Contudo, tem as suas limitações: algumas fontes de erro incluem encher demasiado ou não encher o suficiente o poço, tocar nos lados do poço ao enchê-lo, e tempo e temperatura de incubação incorretas. Além disso, tem um preço bastante elevado, pelo que tem sido substituída por métodos mais sensíveis e automatizados, como a nefelometria e ELISA (Stevens, 2009).

2.2. Nefelometria

A nefelometria mede a luz que é dispersa quando um raio de luz incidente atravessa uma suspensão. A quantidade de luz que é dispersa traduz-se num índice da concentração da solução. Começando com uma quantidade constante de anticorpo, aumentando a quantidade de antigénio resulta num aumento da quantidade de complexos anticorpo-antigénio. Sendo assim, a relação entre a concentração de antigénio, dada pela formação desses complexos, e a luz dispersa aproxima-se da linearidade. Os nefelómetros medem a dispersão de luz numa variedade de ângulos, desde os 10° até aproximadamente 90° .

Outra técnica com metodologia semelhante à nefelometria é a turbidimetria e embora a sua sensibilidade tenha aumentado, os métodos nefelométricos são geralmente mais sensíveis que os ensaios turbidimétricos e têm um limite de deteção inferior. Além disso, podem ser atingidos limites de deteção ainda mais baixos em vários fluidos como LCR e urina devido à sua baixa concentração em lípidos e proteínas (Burtis e Bruns, 2015).

A nefelometria pode ser usada para detetar quer antigénios, quer anticorpos, mas é habitualmente usada com anticorpos conhecidos como reagentes, para a pesquisa do antigénio do doente. Na nefelometria de tempo fixo a reação ocorre essencialmente até ao seu final, mas as partículas de maior tamanho deixam de estar em solução e há uma diminuição na quantidade de luz dispersa. No segundo método nefelométrico, a nefelometria cinética, a quantidade de luz dispersa é medida imediatamente após a adição do reagente. Em ensaios de medição do ritmo de formação de imunocomplexos, as medições são habitualmente feitas no início da reação, visto que a maior alteração na intensidade da luz dispersa em relação ao tempo ocorre neste intervalo de tempo. Se a quantidade de

anticorpo for mantida constante, a quantidade de luz dispersa está diretamente relacionada com a concentração de antígeno, pelo que muitos instrumentos automatizados utilizam este método para a medição de proteínas séricas.

A quantificação de imunoglobulinas como IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, bem como as cadeias leves livres λ e κ é feita exclusivamente por nefelometria. Outras proteínas séricas quantificadas incluem os componentes do complemento, a proteína C reativa, e vários factores de coagulação. A nefelometria providencia uma quantificação precisa das proteínas séricas e devido à fácil automatização o custo por teste é tipicamente mais baixo do que outros métodos. No entanto, os métodos nefelométricos apresentam algumas desvantagens, nomeadamente os custos elevados dos instrumentos e dos reagentes, variabilidade nos diferentes antissoros utilizados, e presença de substâncias que podem interferir com a dispersão de luz (Stevens, 2009) (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

2.3. Eletroforese

A maior parte das proteínas possui uma carga elétrica quando sujeitas a um campo elétrico, característica que permite a sua separação por eletroforese. A eletroforese refere-se à migração de solutos ou partículas carregadas dentro de um meio líquido sobre a influência de um campo elétrico. O tamanho e a forma de uma molécula proteica, a força iónica da solução tampão usada, a resistência e fricção do meio de suporte utilizado, a corrente aplicada, a temperatura da reação e a duração de aplicação da corrente são fatores que influenciam a migração de proteínas numa reação electroforética típica (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

A eletroforese de zonas é a técnica habitualmente utilizada em laboratórios clínicos. Como o nome indica, esta técnica origina zonas de proteínas que são heterogéneas e fisicamente separadas umas das outras. Este tipo de eletroforese é classificado de acordo com o tipo e estrutura dos materiais de suporte que são utilizados, sendo estes: gel de agarose, acetato de celulose ou gel de poliacrilamida (Burtis e Bruns, 2015).

Depois da eletroforese o gel é tratado com um fixador, como o ácido acético, que leva à precipitação de proteínas nas posições nas quais terminaram a sua migração. Ocorre depois uma coloração, e o gel é seco e lavado para retirar o excesso de corante. Podem ser usados aparelhos automáticos de leitura densitométrica para gerar traçados e para quantificar as percentagens relativas de proteína em cada fração. Estas percentagens são depois multiplicadas pela proteína total na amostra (quantificada de forma separada) de modo a determinar a concentração de proteína em cada fração (McPherson e Pincus, 2016).

A migração de proteínas em eletroforese de agarose é habitualmente usada para a identificação de proteínas monoclonais em doentes com gamopatias monoclonais. Na eletroforese de proteínas do soro, as bandas coradas de proteínas que representam a albumina, α_1 , α_2 e β -globulinas são facilmente distinguíveis. Enquanto que as bandas das proteínas mais abundantes, como a albumina, são claramente visíveis e definidas, as bandas das imunoglobulinas, que migram na região γ , são frequentemente difusas e largas. Esta falta de resolução deve-se à presença de muitas imunoglobulinas electroforéticamente heterogéneas que migram na mesma região (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

A eletroforese de proteínas do soro pode ser usada para identificar qualitativamente ou semiquantitativamente, por análise visual ou densitométrica, a presença de imunoglobulinas monoclonais, hipogamaglobulinémia, síndrome nefrótica, e hipergamaglobulinémia policlonal, entre outros. A análise densitométrica de proteínas coradas após a eletroforese de proteínas do soro é um método aceitável para seguir a resposta à terapêutica de doenças caracterizadas por proteínas monoclonais depois de um diagnóstico inicial (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Além da análise do soro, podem ser avaliados por eletroforese outros fluidos corporais. Amostras de urina são rotineiramente testadas em doentes com proteínas séricas monoclonais de modo a identificar componentes proteicos monoclonais, particularmente cadeias leves livres (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

2.4. Imunofixação

Na imunofixação primeiro é realizada uma técnica de eletroforese em gel de agarose para separar as proteínas presentes na mistura. Depois do processo electroforético são aplicados antissoros diretamente no gel, que causam a precipitação das proteínas de interesse. O imunoprecipitado fica preso na matriz do gel, e todas as outras proteínas que não precipitaram são removidas com recurso a uma lavagem. O gel é posteriormente corado para se proceder à identificação de proteínas (Burtis e Bruns, 2015).

Os anticorpos que são usados têm uma especificidade conhecida, de modo a averiguar se um determinado antigénio está presente na amostra. A amostra que poderá conter o antigénio de interesse é colocada no gel, ocorre a eletroforese, e o anticorpo específico é aplicado. Apenas se formam imunoprecipitados quando ocorre uma combinação entre antigénio e anticorpo, pelo que os complexos formados ficam presos no gel. De seguida o gel é lavado com o objetivo de remover proteínas que não tenham precipitado e depois pode ser corado para melhor visibilidade. Habitualmente, o soro do doente é

aplicado em seis colunas do gel, e depois da eletroforese, cinco dessas colunas são sobrepostas com um anticorpo específico: IgG, IgA, IgM, cadeias leves livres κ e λ . A sexta coluna é sobreposta com todos estes anticorpos, e serve como referência, pelo que as reações nas cinco colunas são comparadas com a coluna de referência. Hipogamaglobulinémias aparecem como bandas que quase não se discernem, enquanto que hipergamaglobulinémias policlonais aparecem como bandas fortemente coradas na região γ . Bandas monoclonais, como aquelas que aparecem no mieloma múltiplo (MM), consistem em bandas escuras e estreitas em colunas específicas (Stevens, 2009).

Embora o soro seja a amostra mais comum, a imunofixação também pode ser realizada na urina ou no LCR. O LCR é a amostra perfeita para o diagnóstico de esclerose múltipla, enquanto que a urina é usada para a deteção da proteína de Bence-Jones, detetada em casos de MM (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Esta técnica tem várias vantagens, como a obtenção de resultados mais rapidamente, sensibilidade aumentada, maior resolução e maior facilidade na interpretação de resultados. No entanto, tem também várias desvantagens, como o custo mais elevado dos antissoros utilizados e a necessidade de se proceder a diluições de modo a evitar zonas de excesso de antígeno, situação que se verifica quando as concentrações de anticorpos monoclonais são muito elevadas (Stevens, 2009) (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

2.5. Fluorescence enzyme immunoassay (FEIA)

O método FEIA é o método utilizado nos aparelhos automatizados empregados na pesquisa da IgE específica (ImmunoCAP). Consiste num ensaio em sandwich, no qual há a ligação de antígenos a anticorpos específicos.

Neste método existem poços recobertos com alérgenos, comercialmente disponíveis, fixados a uma fase sólida. Estes alérgenos são reconhecidos por anticorpos IgE específicos presentes na amostra do doente, constituindo marcadores para uma determinada doença alérgica.

Quando ocorre este reconhecimento, forma-se um complexo antígeno-anticorpo e numa fase seguinte há a ligação a este complexo de um anticorpo secundário anti-IgE, conjugado com uma enzima, formando-se um imunocomplexo. Após cada etapa há uma fase de lavagem de modo a remover quaisquer elementos que não se ligaram.

A adição do substrato da enzima faz com que seja emitido um sinal de fluorescência. A medição e a comparação deste sinal de fluorescência com aquele de calibradores de

concentrações conhecidas permitem a determinação da concentração de IgE específica na amostra (Schmidt *et al.*, 2012).

3. Estudo das proteínas do soro

3.1. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas, também conhecidas por anticorpos, são um grupo heterogêneo de glicoproteínas produzidas por plasmócitos, e têm duas funções. Existem até 100 milhões de imunoglobulinas diferentes, cada uma com uma especificidade antigénica diferente, sendo a sua primeira função o reconhecimento e a ligação a antígenos. A eliminação de material estranho ao organismo é a sua segunda função; a ligação de um anticorpo a um antígeno (complexo anticorpo-antígeno) inicia uma série de eventos biológicos importantes, como a ativação do complemento ou a ligação do imunocomplexo a receptores nos leucócitos (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016) (Turgeon, 2013).

Uma imunoglobulina é constituída por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias livres, igualmente idênticas. O terminal amino destas cadeias é designado por região variável, uma vez que varia significativamente entre diferentes classes de imunoglobulinas. O terminal carboxi, no entanto, é denominado por região constante, visto que a sua estrutura principal é a mesma para todas as imunoglobulinas da mesma classe. Os aminoácidos nas regiões variáveis das cadeias leves e pesadas interagem para formar o local onde se liga o antígeno, tendo cada imunoglobulina dois destes locais (Burmester e Pezzutto, 2003).

Relativamente às cadeias leves, existem duas classes de cadeias leves, κ e λ , que diferem na sequência de aminoácidos da região constante (o rácio de cadeias leves κ para λ no plasma de adulto é de 2 para 1), enquanto que há cinco classes de cadeias pesadas.

Quanto às cadeias pesadas, as cinco grandes classes de imunoglobulinas (G, A, M, D, E) correspondem às cinco classes de cadeias pesadas (γ , α , μ , δ , ϵ). Uma imunoglobulina pode conter cadeias leves λ ou cadeias leves κ , mas não as duas simultaneamente:

- **IgG:** esta imunoglobulina é a mais abundante no plasma de um indivíduo adulto, perfazendo cerca de 80% da imunoglobulina total e é o anticorpo predominantemente produzido durante a resposta imunitária secundária. Há quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), cada subclasse com uma região constante da cadeia pesada particular e com diferentes funções. A subclasse mais abundante é a IgG1, que perfaz cerca de 65% da IgG total do plasma.
- **IgA:** as moléculas de IgA constituem cerca de 13% das imunoglobulinas totais do plasma. Há duas grandes classes de IgA, designadas por IgA1 e IgA2, sendo que a IgA1

é a mais abundante. Estes anticorpos são sintetizados durante a resposta imunitária secundária e contribuem para a imunidade das mucosas.

- IgM: Esta classe de imunoglobulinas constitui cerca de 6% das imunoglobulinas totais do plasma. Têm um peso molecular bastante elevado (pelo que são designadas por macroglobulinas), e são constituídas pela ligação de cinco cadeias idênticas.
- IgD: As moléculas de IgD representam apenas 1% das imunoglobulinas do plasma, e são expressas nos linfócitos B juntamente com as IgM.
- IgE: A IgE tem sido chamada o anticorpo reagente para denotar a sua associação com a hipersensibilidade imediata. Estes anticorpos constituem uma percentagem muito pequena das imunoglobulinas totais. A ligação de um anticorpo IgE a um antígeno pode induzir a libertação de aminas vasoativas, proteases, mediadores inflamatórios e citocinas.

A quantificação da concentração de imunoglobulinas totais é realizada com recurso a nefelometria. As concentrações de imunoglobulinas variam bastante consoante a idade. Um exemplo é a flutuação da concentração de IgG no decurso do crescimento de uma criança; as concentrações de IgG de um recém-nascido são quase iguais àquelas que se observam em adultos, como resultado de uma transferência transplacentar (IgA e IgM maternos não são transferidos). Estas concentrações de IgG vão diminuindo até aos 6 meses de idade, altura em que voltam a aumentar até atingirem concentrações semelhantes ao adulto no início da adolescência. Este exemplo demonstra que é necessário ter em conta a idade do doente aquando da interpretação das concentrações de imunoglobulinas (Ochs, Smith e Puck, 2007) (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

A concentração muito baixa de imunoglobulina é designada por hipogamaglobulinémia, enquanto a concentração muito alta é designada por hipergamaglobulinémia. Muitas imunodeficiências congénitas e adquiridas são caracterizadas por hipogamaglobulinémia. A imunodeficiência humoral congénita mais comum é a deficiência seletiva de IgA. Muitos destes doentes são assintomáticos, mas alguns sofrem infeções recorrentes de mucosas e/ou fenómenos autoimunes. Do outro lado do espectro, há doenças imunológicas nas quais há uma hipergamaglobulinémia, sendo que o MM é frequentemente acompanhado da presença de um pico monoclonal (proteína M) e de uma supressão das gamaglobulinas policlonais normais. Uma parte substancial destes doentes e essencialmente todos os doentes com a macroglobulinémia de Waldenström apresentam um aumento monoclonal de imunoglobulinas no soro, na urina ou em ambos. Uma parte importante do diagnóstico e do seguimento de doentes inclui a eletroforese das proteínas

do soro e a imunofixação tanto do soro como da urina. As imunoglobulinas monoclonais ou componentes de imunoglobulinas, como é o caso das cadeias leves livres, são considerados marcadores tumorais (Kyle e Rajkumar, 2009) (Ochs, Smith e Puck, 2007).

3.2. Eletroforese de proteínas do soro

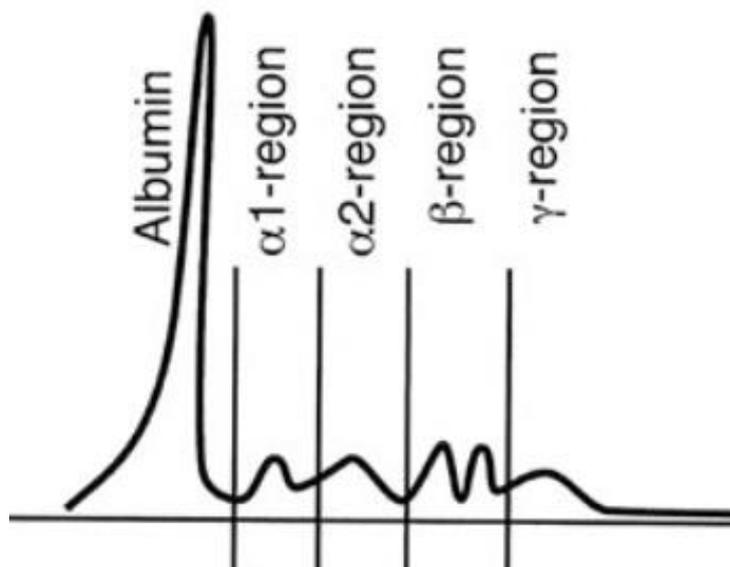


Figura 1 – Padrão electroforético normal, com a divisão das diversas regiões (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

A eletroforese de proteínas é realizada no soro e na urina para detetar e quantificar gamopatias monoclonais. Esta técnica tira partido da vantagem de que cada grande classe de proteínas tem a sua estrutura única. Esta estrutura complexa e as características de carga destes aminoácidos, bem como a sequência única de aminoácidos de cada proteína e o pH da solução tampão usada, determinam a migração de cada proteína durante o processo de eletroforese (Keren, 2003) (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Tendo por base a migração das proteínas durante o processo electroforético em gel de agarose foi possível classificar as proteínas em 5 grandes regiões: albumina, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , e γ . Algumas das principais proteínas pertencentes a estas regiões são as seguintes:

- Transtirretina: antigamente chamada de pré-albumina, é usada essencialmente para analisar o estado nutricional dos doentes com malnutrição proteica. A concentração normal no soro é demasiado baixa para ser avaliada por eletroforese, pelo que é normalmente medida por nefelometria.
- Albumina: a albumina é a principal proteína do soro. É responsável pelos efeitos osmóticos das proteínas séricas e serve como proteína de transporte para uma grande variedade de moléculas.

- $\alpha 1$ antitripsina: trata-se de uma proteína membro dos inibidores da protéase sérica, inibindo uma grande variedade de protéases, como a tripsina, e é a principal proteína da região $\alpha 1$.
- $\alpha 2$ macroglobulina: esta proteína também tem a função de inibir protéases, não sendo, no entanto, uma proteína de fase aguda. A sua concentração encontra-se elevada em doentes com síndrome nefrótico principalmente devido ao seu elevado tamanho.
- Transferrina: esta proteína é a principal proteína da região $\beta 1$, tendo como função o transporte de ferro. Durante as reações de fase aguda, a sua concentração diminui.
- C3: trata-se do terceiro componente do sistema do complemento e é o único que é visível na eletroforese de proteínas do soro, sendo a principal molécula da região $\beta 2$. Os níveis de C3 estão elevados em reações de fase aguda e, se a amostra não for refrigerada, rapidamente se degrada em componentes mais pequenos.
- As imunoglobulinas migram essencialmente na região β e γ :
 - A IgG migra na região γ , e no MM há o aparecimento de uma banda larga nesta região. Aumentos policlonais de IgG ocorrem em infeções crónicas, doenças hepáticas, e algumas doenças autoimunes. Estes aumentos policlonais de IgG podem ser distinguidos da monoclonalidade ao realizar uma imunofixação (Khosroshahi e Stone, 2011).
 - A IgM migra na região β - γ e é uma molécula que existe como um pentâmero.
 - A IgA existe no soro existe como um monómero, mas nas secreções das mucosas existe como um dímero. Um aumento policlonal de IgA resulta numa ponta entre as regiões β - γ , que pode ser bastante proeminente em situações de cirrose.
 - A IgD está principalmente presente na superfície de linfócitos, enquanto que no soro são encontradas baixas quantidades.
 - A IgE encontra-se essencialmente à superfície de mastócitos e basófilos. As concentrações séricas apenas são medidas em casos de alergia.
 - Cadeias leves livres λ e κ normalmente existem em concentrações demasiado baixas no soro para serem medidas por eletroforese, pelo que são quantificadas por nefelometria.

3.3. Principais alterações do perfil electroforético

3.3.1. Padrão electroforético de cirrose

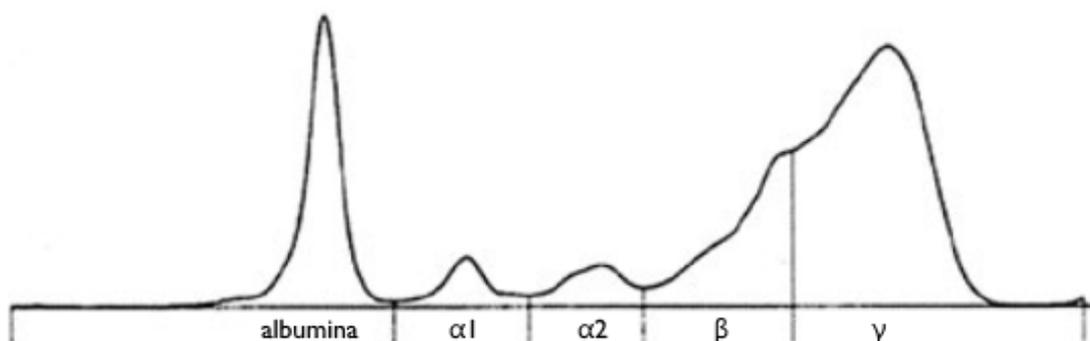


Figura 2 – Padrão electroforético característico de cirrose, mostrando uma diminuição na região da albumina e um aumento na região γ (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Este é o padrão electroforético de uma doença hepática: em doentes com cirrose, a síntese de proteínas derivadas de hepatócitos, como a albumina, está diminuída, levando a um aumento na região $\alpha 2$ através da região γ . No entanto, devido à inflamação e ao desvio da corrente sanguínea à volta do fígado, podem estar aumentadas outras proteínas.

Quando a bilirrubina está elevada, tipicamente ocorre uma hipoalbuminémia no soro, além de que a banda da albumina pode ficar alargada. Uma diminuição das globulinas pertencentes à $\alpha 2$ também pode ocorrer devido ao aumento policlonal de IgA e há um aumento generalizado na região γ , o que reflete o aumento policlonal de IgG (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

3.3.2. Padrão electroforético de síndrome nefrótica

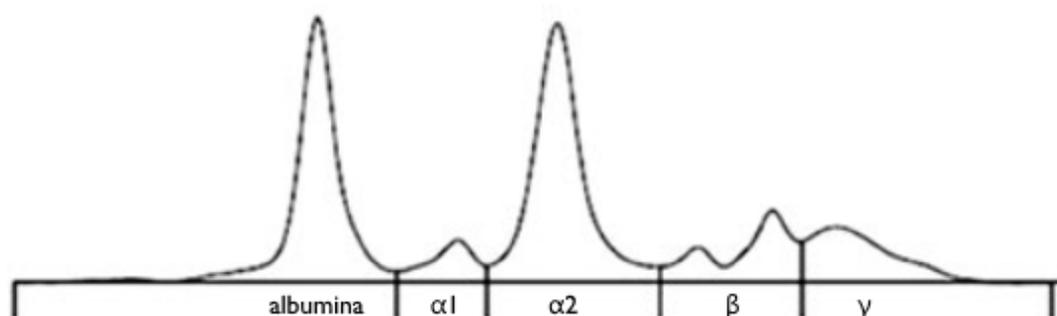


Figura 3 – Este padrão electroforético demonstra um padrão característico de síndrome nefrótica. Verifica-se uma grande elevação da região $\alpha 2$, bem como uma redução drástica da albumina (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Numa situação de síndrome nefrótica a perda de proteína ocorre devido a lesões glomerulares. Verifica-se hipoalbuminémia e uma redução das globulinas pertencentes à região $\alpha 1$. No padrão electroforético verifica-se uma elevação significativa da região $\alpha 2$

devido à retenção de moléculas de grande peso molecular, como a α_2 macroglobulina e a haptoglobina. A região β também pode estar elevada devido a uma elevação dos níveis de β_1 lipoproteína. Dependendo da severidade do síndrome nefrótico, a região γ está baixa ou pode mesmo encontrar-se numa situação de hipogamaglobulinémia.

Numa enteropatia na qual ocorre perda de proteína, como a doença celíaca, os danos no trato gastrointestinal podem levar a que se verifique um padrão electroforético semelhante àquele que se verifica no síndrome nefrótico, com hipoalbuminémia, hipogamaglobulinémia e ocasionalmente com uma elevação da α_2 macroglobulina.

Padrões mais ligeiros de perda de proteína podem resultar apenas num aumento de albumina e no aumento da região γ . Visto que a maior parte dos procedimentos de eletroforese de proteínas do soro são realizados em doentes nos quais a presença de uma proteína monoclonal constitui um diagnóstico diferencial, quando se observam estes padrões, recomenda-se a realização de uma eletroforese de proteínas da urina, bem como uma imunofixação, de modo a excluir a possibilidade de proteínas de Bence Jones, que podem danificar o glomérulo (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

3.3.3. Padrão electroforético de proteínas monoclonais

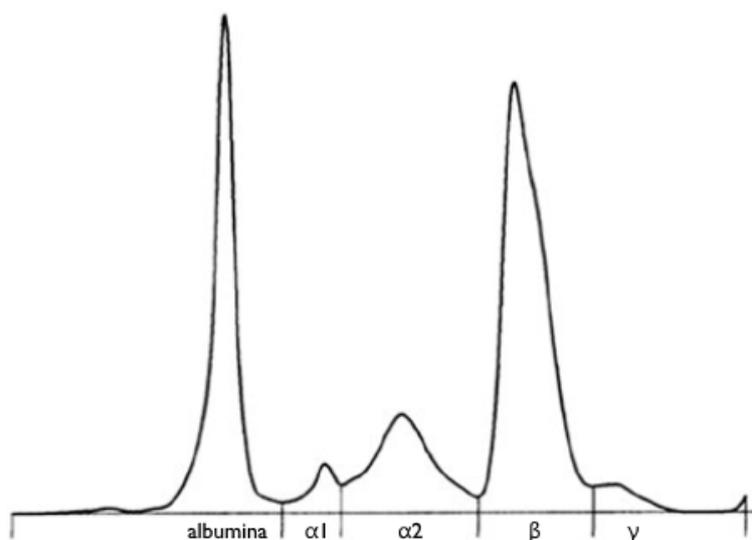


Figura 4 – Este padrão electroforético apresenta uma elevação bastante elevada da região β devido à presença de uma proteína monoclonal IgM (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

A maior parte das proteínas monoclonais pertencem à classe IgG e habitualmente migram na região γ . Uma vez que a IgG normal migra normalmente na região β - γ , mesmo concentrações muito baixas de IgG monoclonal têm a capacidade de alterar o padrão normal, especialmente em situações de hipogamaglobulinémia.

As proteínas monoclonais, especialmente aquelas pertencentes às classes de IgA e IgM, também são detetadas na região β . No entanto, quando uma proteína monoclonal pertencente a estas classes se encontra em baixa concentração, torna-se mais difícil de detetar. Isto acontece devido à presença de outras proteínas na região β , como a transferrina e a β 1 lipoproteína.

Na região α 2 é raro encontrar proteínas monoclonais. Se de facto se encontrarem nesta região, são mais difíceis de detetar, devido à elevada concentração das proteínas que migram nesta região. Este exemplo constitui uma razão pela qual uma eletroforese das proteínas do soro negativa (com o objetivo de pesquisar proteínas monoclonais) não exclui a possibilidade de existência de uma proteína monoclonal. Nestes casos e quando há uma suspeita forte de que o doente possui uma proteína monoclonal, deve ser realizada uma imunofixação (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

3.4. Quantificação de proteínas monoclonais no soro

O limite mais baixo para a visualização de proteínas monoclonais em sistemas electroforéticos está entre 0.02 e 0.04 g/dL. Enquanto que a maior parte das proteínas monoclonais se incluem na categoria de gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), algumas proteínas monoclonais podem ser observadas em doentes com mieloma das cadeias leves e outros processos linfoproliferativos da célula B, como a leucemia linfocítica crónica (LLC) (Murray *et al.*, 2012).

Sendo detetada e caracterizada a proteína monoclonal, é necessário tentar quantificá-la. Quando se estuda a resposta à terapêutica, o valor mínimo medido é de 1.0 g/dL. Porém, é necessário ter cuidado com possíveis interferentes, como as imunoglobulinas policlonais na região γ e as restantes proteínas na região β (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Para proteínas monoclonais que migram claramente na região γ , a sua quantificação deve ser feita com recurso a densitometria. De outro modo, proteínas monoclonais cuja concentração é demasiado baixa ou que são obscurecidas por outras proteínas, como a transferrina, não são quantificadas (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

4. Estudo das proteínas da urina

4.1. Detecção de proteínas monoclonais e de proteínas de Bence Jones na urina

As proteínas de Bence Jones são cadeias leves livres monoclonais κ ou λ que não estão associadas a cadeias pesadas. Estas proteínas tipicamente aparecem como monómeros ou como dímeros que passam no filtrado glomerular. São encontradas em 5% de todos os doentes com gamopatias monoclonais e em cerca de 20% dos doentes com MM (Turgeon, 2013).

Em doenças das cadeias leves livres monoclonais, como o MM de cadeias leves, a concentração sérica destas cadeias é habitualmente muito pequena e a proteína monoclonal muitas vezes não é detetada. No entanto, como as cadeias leves livres são livremente filtradas pelo rim, a probabilidade de as encontrar na urina de um doente com doenças relacionadas com estas cadeias é muito maior. Além disso, cerca de 75% dos doentes com MM com uma proteína monoclonal no soro terão cadeias leves livres na urina (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

É importante realçar que a análise de rotina de proteínas na urina não é um indicador de confiança da presença ou ausência de cadeias leves livres monoclonais. Alguns testes de deteção de proteínas apenas têm sensibilidade para a albumina, e podem mesmo dar negativo para urinas contendo estas cadeias. Como é bastante comum não encontrar alterações na urina de um doente após a realização de uma eletroforese, mas havendo, ainda assim, a probabilidade da presença de uma proteína monoclonal nessa mesma amostra, é recomendado a realização de uma imunofixação (Keren, 2003).

Antes da realização da eletroforese, as amostras de urina necessitam de ser concentradas para aumentar a sensibilidade de deteção de proteínas monoclonais. Esta concentração é atingida através de um processo de ultrafiltração. A concentração final de proteínas na urina deve estar entre 1000 e 8000 mg/dL (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Para a deteção e quantificação de proteínas monoclonais na urina, bem como para o seguimento do doente, é recomendado usar uma amostra de urina de 24h. Contudo, se o objetivo for apenas a deteção, pode ser usada a primeira urina da manhã, apesar de que esta amostra não permite nem a quantificação nem o seguimento do doente. Quando uma proteína monoclonal é detetada em eletroforese de proteínas, pode ser quantificada por análise densitométrica (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Relativamente à deteção de proteínas de Bence Jones, a primeira urina da manhã é a melhor amostra. No entanto, se o objetivo for apenas a deteção, a medição destas proteínas pode ser feita por nefelometria. Porém, assim que forem detetadas, o doente deve ser

seguido através da medição destas mesmas proteínas em amostras de urina de 24h (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Ocasionalmente é detetada uma imunoglobulina intacta na urina, contudo estes casos apenas se verificam em doentes com lesões renais e proteinúria glomerular ou tubular significativa. Dois achados comuns em amostras de urina contendo grandes quantidades de cadeias leves livres monoclonais são um excesso de antigénio e um artefacto causado pelo facto da proteína monoclonal não ser completamente lavada do gel (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

As cadeias leves livres monoclonais e as proteínas monoclonais tradicionais podem migrar em qualquer uma das regiões electroforéticas, desde α até γ . O que habitualmente acontece é a deteção, tanto da proteína monoclonal como das proteínas de Bence Jones, em doentes com MM. Nestes casos a imunofixação da urina é comparada com a eletroforese de proteínas de modo a determinar qual a banda que corresponde às proteínas de Bence Jones (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Se for encontrada uma proteína monoclonal na urina e não tiver sido pedida a avaliação do soro para a pesquisa de proteínas monoclonais, esse pedido deve ser recomendado, e vice-versa (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

4.2. Deteção de outras proteínas na urina

Em amostras de urina concentrada e através de um processo electroforético, também é possível detetar pequenas concentrações de outras proteínas não monoclonais, como a albumina. A concentração normal desta proteína numa amostra de urina de 24h pode ir até 150 mg, apesar desta quantidade poder estar aumentada depois de exercício físico intenso e em doentes com diabetes (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Lesões glomerulares permitem o aparecimento de proteínas na urina que não passam eficientemente através da barreira glomerular. Desde que a função de reabsorção tubular esteja intacta, não se vêem bandas na região α_2 e β . No entanto, quando é excedida a capacidade de os túbulos reabsorverem proteínas, é possível ver pequenas bandas nestas regiões, bem como uma banda adicional na região γ . Quando existe uma doença renal extensa e pelo rim estar tão danificado, o padrão de eletroforese de proteínas na urina aproxima-se ao padrão normal da eletroforese de proteínas no soro (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Se apenas os túbulos estiverem danificados, uma grande quantidade das pequenas proteínas do soro que normalmente passam através do glomérulo não são reabsorvidas e

aparecem na urina. Nesta situação encontram-se na urina pequenas quantidades de albumina e numerosas bandas de vários tamanhos nas regiões α_1 , α_2 , β e γ , perfazendo o padrão típico de proteinúria tubular (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Quando está presente um grande excesso de uma molécula relativamente pequena, como a hemoglobina, e se a quantidade excretada é superior a capacidade de reabsorção tubular, observa-se um padrão de proteinúria, e a situação tem de ser avaliada por imunofixação, pois a banda que se observa pode representar uma proteína monoclonal (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

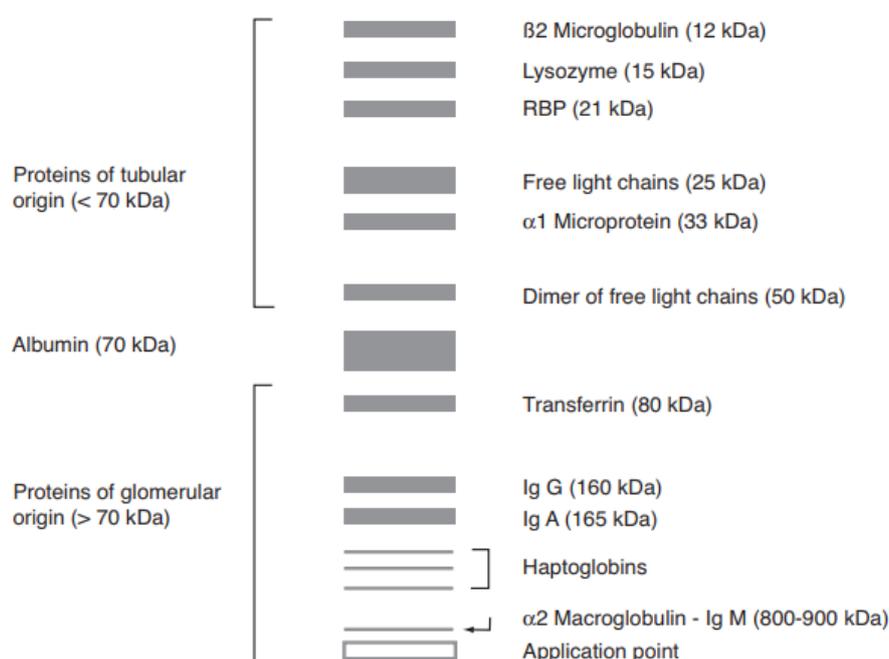


Figura 5 – Este gráfico demonstra a posição das bandas correspondentes às proteínas mais frequentemente encontradas num padrão de eletroforese de proteínas (Carrer, Le e Boucraut, 1999).

5. Determinação da IgE específica

5.1. Hipersensibilidade

A hipersensibilidade pode ser definida como uma resposta imunológica normal, mas exagerada e descontrolada a um antígeno, que pode produzir inflamação, destruição celular ou danos tecidulares. É classificada consoante o tempo após a exposição ao antígeno que essa resposta demora a aparecer. Assim, há hipersensibilidade imediata e hipersensibilidade retardada, sendo a primeira mediada por anticorpos, enquanto que a segunda é mediada por células (Turgeon, 2013).

O termo imunização, ou sensibilização, descreve uma reação imunológica dependente da resposta do hospedeiro a uma exposição subsequente a um antígeno, isto é, uma

segunda exposição. Pequenas quantidades de antigénio podem favorecer a sensibilização ao restringir a quantidade de anticorpo formado. A existência dessa sensibilização é revelada quando há uma segunda exposição ao mesmo antigénio, levando a que se desenvolva uma reação de hipersensibilidade (Turgeon, 2013).

5.2. Alergia

O conhecimento acerca da alergia começou com a descoberta da imunoglobulina IgE em 1967. A propriedade mais significativa destes anticorpos é a sua capacidade de poderem ser específicos para centenas de antigénios diferentes. Os antigénios que despoletam as reações alérgicas são designados por alergénios. Estas substâncias de baixo peso molecular conseguem entrar no organismo ao serem inaladas, ingeridas, ou administradas enquanto fármacos ou drogas. Alergénios comuns incluem pelos de animais, pólen, comida, pó, metais, drogas e picadas de insetos (Turgeon, 2013).

5.3. Tipos de reações de hipersensibilidade

São classificados quatro tipos de reações de hipersensibilidade, definidos consoante o mecanismo principal responsável pelo dano celular ou tecidual que ocorre durante uma resposta imunológica. Os três primeiros tipos são mediados por anticorpos, enquanto que o quarto é mediado por células. Há algumas sobreposições nos diferentes tipos de reações de hipersensibilidade, mas há grandes diferenças no modo como cada tipo é diagnosticado e tratado. Neste relatório serão discutidas apenas as reações de hipersensibilidade de tipo I (Turgeon, 2013).

5.4. Reações de hipersensibilidade de tipo I

As reações de hipersensibilidade de tipo I podem variar desde reações anafiláticas que representam um risco de vida até manifestações mais suaves, como aquelas que se observam frequentemente na alergia a determinados alimentos.

De um ponto de vista imunológico, tanto os mastócitos como os basófilos possuem recetores celulares para a IgE, que se liga à sua superfície externa. Os grânulos que possuem no seu interior contêm uma mistura de heparina, histamina e iões de zinco (Turgeon, 2013).

Quando um alergénio interage com IgE ligada à superfície de mastócitos ou basófilos, ocorre um processo designado por desgranulação, consistindo na libertação de mediadores químicos preformados associados aos grânulos, lípidos derivados da membrana, citocinas e

quimiocinas, levando a que se verifique uma reação alérgica aguda, isto é, uma reação de hipersensibilidade imediata (Turgeon, 2013).

Histamina, leucotrieno C4, IL-4 e IL-13 são os principais mediadores da alergia e da asma. Todas estas substâncias são formadas pelos basófilos e libertadas em grande quantidade após a estimulação com IL-3, cujo efeito está restrito aos grânulos dos basófilos (Turgeon, 2013).

Por fim, quanto às reações anafiláticas, estas são a resposta clínica à formação e fixação imunológica entre um antigénio e um anticorpo ligado a um determinado tecido. Esta reação é mediada por anticorpos IgE e ocorre de acordo com os três passos seguintes:

1. O antigénio liga-se à IgE fixada na superfície da membrana de um mastócito ou basófilo. É necessário o “*cross-linking*” de dois anticorpos IgE para iniciar a desgranulação.
2. Os mastócitos e basófilos ativados libertam vários mediadores químicos.
3. Esta libertação tem vários efeitos, tais como mudanças vasculares e ativação de plaquetas, eosinófilos, neutrófilos e da cascata de coagulação.

5.5. Sinais e sintomas

Numa pessoa com alergia, a exposição da pele, nariz ou vias aéreas a uma única dose de alergénios rapidamente produz vários sintomas. Dependendo da quantidade de alergénio, as reações de hipersensibilidade imediata são seguidas de uma reação retardada que atinge o seu pico 6 a 9h após a exposição ao alergénio, sendo que depois diminui lentamente.

Existem dois tipos de reações: reações localizadas e reações generalizadas. Uma reação localizada ocorre como uma resposta imediata a mediadores libertadores pela desgranulação de mastócitos. As reações locais podem consistir em urticaria e angioedema da pele no local da exposição ao antigénio. Este fenómeno é o princípio básico do teste da pele para o diagnóstico de uma alergia ou para confirmar a sensibilidade a um antigénio específico. Também pode ocorrer angioedema no trato gastrointestinal após a ingestão de determinados alimentos.

As reações generalizadas, também chamadas de anafiláticas, são provocadas por mediadores como citocinas e aminas vasoativas, como a histamina, provenientes de mastócitos. São reações dramáticas e extremamente rápidas no seu começo. Os efeitos fisiológicos de mediadores primários e secundários nos órgãos alvos, como o sistema cardiovascular e respiratório, definem os sinais e sintomas da anafilaxia. Os mediadores naturais do corpo contra a anafilaxia são enzimas que degradam os mediadores da mesma.

5.6. Avaliação laboratorial de reações alérgicas

As bases do diagnóstico de alergia incluem a quantificação de níveis de IgE específica no soro do doente associado a uma história clínica. A detecção no soro de uma quantidade aumentada de IgE total ou de uma IgE específica (para um determinado alérgeno) indica que há uma probabilidade aumentada de haver uma reação alérgica, infecção parasitária ou aspergilose (Hage, Hamsten e Valenta, 2017).

A determinação da concentração de anticorpos IgE no soro é uma componente essencial no diagnóstico de doenças alérgicas e na identificação do alérgeno responsável. A qualidade e a disponibilidade de alérgenos teste, bem como a estabilidade de reagentes e o grau de automatização são fatores que influenciam o método de análise. Tendo por base milhares de resultados de teste, é traçada uma curva genérica que indica a relação entre concentrações de IgE específica e os sintomas apresentados pelo doente. Embora um diagnóstico final tenha sempre de ser baseado na avaliação global do doente pelo clínico, uma regra geral é que, quanto maior a concentração de IgE, maior a probabilidade da ocorrência de sintomas específicos de alergia (Turgeon, 2013).

O ImmunoCAP da Phadia é o “*gold standard*” para a análise de IgE específica. Estes ensaios podem ser realizados para centenas de alérgenos, como pólen, alimentos, e pelos de animais. Estão disponíveis mais de 650 alérgenos diferentes e mais de 70 componentes de alérgenos para uma detecção quantitativa, sensível e específica de anticorpos IgE (Hage, Hamsten e Valenta, 2017).

O maior benefício deste sistema é a quantificação do nível de IgE específica e a ausência de interferência de anticorpos IgG específicos. Os testes do ImmunoCAP baseiam-se na ligação de anticorpos IgE que se encontram no soro do doente a alérgenos ligados a uma fase sólida. A este complexo anticorpo-antígeno liga-se uma IgE anti-humana, por sua vez ligada a uma enzima, sendo detetada a fluorescência resultante. Esta intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de IgE específica presente na amostra do doente (Hage, Hamsten e Valenta, 2017).

Os alérgenos que são usados no teste e que estão ligados a uma fase sólida encontram-se em excesso, permitindo que haja uma ligação completa da IgE da amostra do doente, levando a uma elevada sensibilidade do ensaio. Soros com níveis de IgE muito elevados podem ser quantificados usando diluições e subseqüentes multiplicações dos resultados (Hage, Hamsten e Valenta, 2017).

As substâncias às quais o doente está normalmente exposto vão determinar quais os alérgenos que vão ser usados nos ensaios do ImmunoCAP. Certos alérgenos causam mais

frequentemente alergia do que outros. Alguns fatores a considerar são a idade do doente, os sintomas, o ambiente em casa, como por exemplo a existência de animais de estimação, e a localização geográfica da casa do doente (Hage, Hamsten e Valenta, 2017).

6. Crioglobulinas

6.1. Introdução

A crioglobulinémia consiste num grupo de síndromes caracterizados pela indução de anormalidades clínicas e/ou laboratoriais pelo frio. Crioglobulinas são imunoglobulinas que precipitam quando se encontram a temperaturas inferiores à temperatura corporal normal e que dissolvem quando são aquecidas. A análise de crioglobulinas é frequentemente pedida quando o doente demonstra sintomas como dor, cianose, fenómeno de Raynaud ou ulceração da pele após exposição ao frio (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016) (Turgeon, 2013).

As crioglobulinas são classificadas do seguinte modo:

- Tipo 1 – o crioprecipitado é IgG, IgA ou IgM monoclonal (ou uma cadeia leve livre crioprecipitável.
- Tipo 2 – o crioprecipitado é misto, contendo duas classes de imunoglobulinas, com pelo menos uma sendo monoclonal.
- Tipo 3 – o crioprecipitado é misto, sem qualquer componente monoclonal.

A frequência relativa dos diferentes tipos de crioglobulinas varia significativamente com o tipo de doença e a sua deteção é afetada pelo cuidado no manuseio da amostra antes da realização dos ensaios laboratoriais. Este cuidado é especialmente importante quando se trata da análise de crioglobulinas de tipo 3, que geralmente estão presentes em baixos níveis e que podem requerer volumes de soro maiores do que o normal (Turgeon, 2013).

Suspeita-se de crioglobulinémia de tipo 1 na presença de uma discrasia plasmática conhecida, como o MM ou a macroglobulinémia de Waldenström, evidencia imunoquímica da presença de um pico monoclonal, presença cadeias leves livres, como as proteínas de Bence Jones no soro ou na urina, ou evidencia clínica de hiperviscosidade ou vasculopatia isquémica. A crioglobulinémia tipo 2 deve ser considerada quando há neoplasias da célula B que podem estar associadas a fatores reumatóides ou outros fenómenos autoimunes, quando se verifica o síndrome de Sjögren ou quando se verifica uma inflamação crónica do fígado, especialmente quando há uma infeção pelo vírus da hepatite C. A crioglobulinémia de tipo 3 tem sido associada a uma grande variedade de doenças infecciosas crónicas e doenças

autoimunes, muitas das quais são caracterizadas por hiperimunização e/ou hiperglobulinemia (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

6.2. Procedimento

O manuseamento apropriado de amostras sanguíneas é a variável mais importante na taxa de sucesso para a identificação de crioglobulinemia e a mais difícil de atingir. Os melhores resultados são obtidos quando o teste para a crioprecipitação é realizado pelo indivíduo em contacto com o doente e quando é tido em conta a importância de separar o soro do sangue a 37°C. Embora seja menos sensível e menos específico que outros testes, a análise da crioprecipitação no soro tem a vantagem de ser uma análise simples, requerendo equipamento mínimo (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

As crioglobulinas precipitam entre as 24h e as 48h, permitindo que muitos soros possam ser analisados dentro de 1 ou 2 dias, havendo assim a vantagem de oferecer ao clínico uma resposta rápida (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

As crioglobulinas de tipo I são facilmente visíveis, aparecendo como “flocos”, ou por vezes como precipitados cristalinos, que se observam dentro de 24h após a separação. Quanto às crioglobulinas de tipo 3, estas são habitualmente gelatinosas e podem demorar uma semana a estarem completamente aparentes. A cinética da crioprecipitação é variável, dependendo da amostra e da concentração de crioglobulina na mesma (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Para testar a possibilidade da existência de crioglobulinas, é colhida uma amostra de sangue, colocada num banho de água quente, e centrifugada à temperatura ambiente. O soro é depois colocado num tubo graduado e armazenado no frio, a 4°C, durante 7 dias. Se passado esse tempo for observado um gel ou um precipitado, o tubo é centrifugado (4°C; 3000 rpm) e o precipitado é lavado a 4°C, redissolvido a 37°C e avaliado por eletroforese e imunofixação. Idealmente, na redissolução, deveria de ocorrer a dissolução completa do precipitado com a agitação. Se isto não ocorre, deve ser considerada a possibilidade da presença de fibrina ou de contaminação bacteriana (Turgeon, 2013) (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

A avaliação por imunofixação permite a caracterização imunoquímica do crioprecipitado, a definição do tipo de crioglobulinemia e a revelação da clonalidade do componente IgM e ou a oligoclonalidade do componente IgG das crioglobulinas mistas (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

Embora muitos laboratórios clínicos realizem a análise e determinação de crioglobulinas, estes procedimentos raramente são realizados de forma rigorosa, além de que existe uma grande variabilidade interlaboratorial. As fontes de erro mais comuns são os falsos negativos devido à perda do crioprecipitado durante o armazenamento da amostra e os falsos positivos, devido à fibrina residual na amostra, bem como a falha na demonstração da redissolução do material com o aquecimento. Contudo, na maior parte dos casos, as crioglobulinas vêm-se claramente através de uma inspeção visual passados 1 a 3 dias (Detrick, Hamilton e Schmitz, 2016).

7. Principais doenças imunoproliferativas

7.1. Características gerais das Gamopatias

A produção de anticorpos pelos linfócitos B está sujeita a uma regulação pelos linfócitos Th, sendo que a sua principal função é a proteção do organismo de infeções por bactérias, vírus ou parasitas. Uma vez que cada organismo patogénico representa uma mistura de diferentes antigénios, há sempre uma estimulação policlonal de células B. Cada clone de célula B produz anticorpos que têm como alvo um antigénio específico (Burmester e Pezzutto, 2003).

A proliferação descontrolada de um único clone de célula B pode ser causada pela degeneração maligna de células B ou pela regulação deficiente por parte de células T. Esta produção aumentada de imunoglobulinas estruturalmente homogêneas pode ser detetada pela eletroforese de proteínas do soro, aparecendo como um pico monoclonal na região γ . Esta produção aumentada designa-se por hipergamaglobulinémia (Burmester e Pezzutto, 2003).

As hipergamaglobulinémias têm uma natureza monoclonal ou policlonal. Uma gamapatia monoclonal consiste em níveis elevados de um único tipo de imunoglobulinas, que têm a designação de proteínas monoclonais, proteínas M, ou paraproteínas, e tanto podem ser benignas como malignas. As gamopatias monoclonais também estão associadas à supressão de imunoglobulinas que não estão envolvidas no processo monoclonal. Há vários tipos de hipergamaglobulinémias, nomeadamente o mieloma múltiplo (MM), a macroglobulinémia de Waldenström, a gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), a doença de cadeias leves, e as doenças de cadeias pesadas. Embora o MM seja a gamapatia monoclonal principal, a mais comum é a MGUS. Relativamente às gamopatias policlonais, estas são classificadas como doenças secundárias e são caracterizadas pela

elevação de duas ou mais imunoglobulinas, produzidas por vários clones de plasmócitos (Turgeon, 2013).

A eletroforese de proteínas do soro e da urina, e outros testes laboratoriais baseados em reações imunológicas, podem originar resultados bastante alterados em doenças como o MM e a macroglobulinemia de Waldenström. A região γ do padrão electroforético pode apresentar uma banda densa e muito restrita resultante da proliferação de um único clone de células, enquanto que as restantes imunoglobulinas se apresentam numa concentração mais baixa (Turgeon, 2013).

Em contraste, alguns doentes sintomáticos não exibem a banda monoclonal característica ou o pico monoclonal na eletroforese de proteínas do soro. Isto é o que habitualmente acontece na doença de cadeias leves, na qual apenas as cadeias leves livres monoclonais κ ou λ são sintetizadas pelo plasmócito maligno. Estes fragmentos de imunoglobulinas de baixo peso molecular são filtrados pelo glomérulo e aparecem na urina, produzindo um padrão electroforético sugestivo de hipogamaglobulinemia, com uma banda muito ténue ou havendo mesmo a ausência de banda. Estas cadeias leves também sugerem a presença de um clone não secretor, isto é, que não produz imunoglobulinas monoclonais e que frequentemente provoca hipogamaglobulinemia devido à inibição de plasmócitos normais (Turgeon, 2013).

7.2. Mieloma múltiplo (MM)

O MM é uma doença imunológica das células B, caracterizada pela acumulação de plasmócitos malignos na medula óssea. As células malignas do mieloma proliferam lentamente na medula e os plasmócitos malignos circulantes podem disseminar o tumor noutros locais do organismo, levando à falência generalizada de órgãos. Menos de 1% dividem e não se diferenciam. O número absoluto destas células correlaciona-se com a atividade da doença e é um indicador da progressão da doença na “*smoldering multiple mieloma*” (Turgeon, 2013) (Burmester e Pezzutto, 2003).

A medula óssea normal tem cerca de 1% de plasmócitos, mas numa situação de MM esta concentração pode atingir os 90%. A identificação de plasmócitos monoclonais na medula óssea mediante uma análise histológica é uma parte essencial do diagnóstico e é frequentemente baseada na identificação intracelular de cadeias leves κ ou λ usando técnicas de imunofluorescência direta (Turgeon, 2013).

Os plasmócitos produzem um de cinco tipos de cadeias pesadas juntamente com cadeias leves κ e λ . Há um excesso de produção de cerca de 40% de cadeias leves,

relativamente às cadeias pesadas, de modo a permitir a construção apropriada de imunoglobulinas intactas (Turgeon, 2013).

A causa desta doença imunológica é desconhecida, se bem que é postulado que a radiação possa constituir um fator. Outras causas que têm sido sugeridas são as infeções virais, estímulos ambientais e fatores genéticos (Turgeon, 2013).

Sinais e sintomas de MM incluem dores óssea, fraqueza, cansaço, anemia e hemorragias anormais. A proteinúria é um achado comum em mais de 50% dos doentes que excretam quantidades anormais de proteínas de Bence Jones. Nestes casos, os doentes têm um defeito na imunidade humoral, mas não na celular (Turgeon, 2013).

O diagnóstico laboratorial de MM inclui a eletroforese da urina e do soro. Em cerca de 90% dos doentes é detetada uma proteína monoclonal. A hibridização do DNA e tecnologias de blotting também podem ser utilizadas no diagnóstico, permitindo a deteção de genes alterados em células B (Turgeon, 2013).

7.3. Macroglobulinémia de Waldenström

A macroglobulinémia de Waldenström, ou simplesmente macroglobulinémia, é uma doença das células B caracterizada pela infiltração de células linfoplasmocíticas na medula óssea e pela presença de uma gamapatia monoclonal IgM. Trata-se de uma doença linfoproliferativa que apresenta quantidades anormalmente grandes de imunoglobulinas IgM. À medida que a doença progride há o desenvolvimento de hepatomegalia e linfadenopatia (Turgeon, 2013).

Nos estados avançados da doença há uma libertação leucémica de células na corrente sanguínea, que segregam uma grande quantidade de IgM monoclonal, aumentando a viscosidade do sangue devido à sua estrutura pentamérica. Como resultado, pode desenvolver-se um síndrome de hiperviscosidade, que pode provocar lesões na retina, no sistema nervoso central (SNC) e nas artérias coronárias. Um exemplo de lesões no SNC é a deposição de proteínas monoclonais na bainha de mielina dos neurónios, que pode induzir neuropatia (Burmester e Pezzutto, 2003).

A causa da macroglobulinémia é desconhecida, havendo, contudo, a possibilidade da existência de uma predisposição genética; cerca de 20% destes doentes têm uma predisposição familiar para a doença, além de que tem sido observado uma frequência maior de proteínas monoclonais IgM em familiares de doentes com macroglobulinémia. Por outro lado, vários estudos têm mostrado que há um risco significativamente mais alto de contrair esta doença depois de várias infeções (VHB, VIH). Doentes com uma história de doenças

autoimunes têm também um risco aumentado de desenvolver macroglobulinémia (Turgeon, 2013).

A macroglobulinémia de Waldenström tem uma progressão indolente ao longo de muitos anos. O diagnóstico laboratorial envolve a eletroforese de proteínas do soro, demonstrando uma proteína monoclonal homogênea constituída por IgM monoclonal. As amostras de sangue revelam a hiperviscosidade característica e podem ser detetadas crioglobulinas (Burmester e Pezzutto, 2003).

7.4. Gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS)

A MGUS constitui a presença de uma proteína monoclonal em doentes que não demonstram características de MM ou doenças malignas relacionadas.

As características que diferenciam esta gamapatia de outras doenças da mesma classe são uma concentração sérica de proteína monoclonal inferior a 3g/dL, menos de 10% de plasmócitos na medula óssea, ausência de lesões ósseas, anemia, hipercalemia, insuficiência renal e ausência de sinais e sintomas relacionados com a gamapatia monoclonal (Turgeon, 2013).

Em termos de incidência, cerca de 50% dos doentes com uma gamapatia monoclonal têm uma MGUS e 15% a 20% têm um MM. A incidência de MGUS aumenta com a idade, sendo que a idade média na qual o diagnóstico é feito é 70 anos. Esta doença ocorre com maior frequência nos homens do que nas mulheres, a IgG é a imunoglobulina mais afetada, seguida da IgM e a causa da doença é desconhecida (Turgeon, 2013).

A gamapatia monoclonal é caracterizada pelo rearranjo dos genes de imunoglobulinas, o que resulta na produção de uma proteína monoclonal. Há duas populações de plasmócitos em doentes com uma gamapatia monoclonal de significado indeterminado: plasmócitos normais e policlonais, e plasmócitos clonais com um imunofenótipo anormal. Estas últimas células mantêm-se estáveis durante muitos anos, todavia, após um período prolongado, um número substancial de doentes com uma MGUS evoluem para uma doença maligna das células B, como o MM ou a LLC (Burmester e Pezzutto, 2003).

Os testes laboratoriais recomendados incluem a concentração de hemoglobina, a concentração sérica de cálcio e de creatinina, a eletroforese de proteínas do soro e a eletroforese de proteínas de urina numa amostra de urina de 24h, bem como a realização de uma imunofixação nestes dois tipos de amostras (Turgeon, 2013).

7.5. Doença das cadeias leves

A doença das cadeias leves doença representa cerca de 10% a 15% das gamopatias monoclonais, sendo menos frequente que os mielomas IgG e IgA. Esta doença ocorre tão frequentemente quanto a macroglobulinemia de Waldenström. Na doença das cadeias leves apenas são produzidas cadeias leves livres monoclonais κ ou λ ou proteínas de Bence Jones (Turgeon, 2013).

Quando se suspeita de uma doença das cadeias leves, o procedimento laboratorial para se confirmar o diagnóstico é semelhante ao realizado para qualquer outra doença linfoproliferativa. No entanto, devem ser feitas algumas modificações para ter em consideração a baixa concentração de paraproteína observada nesta doença: deve ser feita uma eletroforese das proteínas do soro e da urina, de modo a determinar qual a concentração de proteína total e deve ser usada uma amostra de urina de 24h, pois todas as proteínas observadas podem ser proteínas de Bence Jones. A examinação visual do padrão electroforético é essencial, pois as bandas produzidas pela presença de cadeias leves livres monoclonais podem por vezes não ser vistas na análise densitométrica. Os padrões electroforéticos produzidos pela análise de uma amostra de soro podem mostrar uma banda típica e bem definida, uma banda difusa provocada pela polimerização da proteína monoclonal, uma região γ normal, ou então hipogamaglobulinemia (Turgeon, 2013)(Burmester e Pezzutto, 2003).

7.6. Doença das cadeias pesadas

A doença das cadeias pesadas é caracterizada pela presença de proteínas monoclonais que consistem nas cadeias pesadas incompletas que constituem as imunoglobulinas. Consoante o tipo de cadeia pesada envolvida na doença, há várias variantes desta doença.

A variante γ está associada a um aumento da produção de cadeias γ monoclonais da classe IgG. Este subtipo provoca linfadenopatia e osteólise (Burmester e Pezzutto, 2003).

A variante α é a variante mais comum e é caracterizada pela secreção patológica de IgA pelos plasmócitos que se encontram no intestino, levando ao desenvolvimento de um síndrome de mal absorção, diarreia, e dores abdominais. Pode ocorrer a obstrução ou perfuração do intestino, e é uma doença que se manifesta nas crianças e nos jovens adultos (Burmester e Pezzutto, 2003).

A variante MU, uma variante rara, ocorre em conjunção com doenças linfoproliferativas, especialmente LLC das células B. Nesta variante também são produzidas

cadeias leves livres, visto que na urina aparecem proteínas de Bence Jones (Burmester e Pezzutto, 2003).

As cadeias pesadas podem ser detetadas no soro, na urina, ou em ambos, dependendo da classe da cadeia pesada envolvida na doença. Quando se suspeita de doença das cadeias pesadas, deve ser usado um antissoro não-específico anti-Fab (Burmester e Pezzutto, 2003).

Microbiologia

I. Introdução

A microbiologia consiste no estudo das interações entre seres humanos e microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas. Embora o interesse principal seja nas doenças causadas por estes microrganismos, a verdade é que alguns destes microrganismos são essenciais na sobrevivência da espécie humana; exemplo disto é a flora comensal, que participa no metabolismo, providencia fatores de crescimento essenciais, protege contra infeções e estimula a resposta imunitária.

O sector da Microbiologia possui a sua própria receção de amostras. Uma vez integradas no sistema informático, são de imediato conhecidos quais os meios que constituirão as primoculturas, que, na maior parte dos casos, são incubadas durante 24h. Após este tempo de incubação, se a cultura for pura, avança-se para testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) e para testes de identificação. Se a cultura não for pura, terá de ser repicada para diferentes meios até se obter uma cultura pura.

2. Aparelhos automatizados

2.1. BACT/ALERT

O equipamento BACT/ALERT consiste num sistema de deteção automática de crescimento microbiano em hemoculturas, baseado na deteção colorimétrica de CO₂ produzido por microrganismos em crescimento. Trata-se de um equipamento modular, permitindo que se adequa às necessidades de cada laboratório.

Anualmente ocorrem milhares de casos de bacteriémia. Devido à elevada mortalidade e morbilidade associada à septicémia, a deteção rápida e exata desta patologia é um dos problemas mais desafiantes da microbiologia clínica.

O período de incubação das garrafas utilizadas é de 5 dias, a uma temperatura de 37°C. As garrafas que permanecem no interior do equipamento durante os 5 dias são negativas, uma vez que durante esse período de tempo não apresentaram crescimento bacteriano detetável pelo equipamento. As garrafas que, de facto, apresentam crescimento são detetadas pelo equipamento e de imediato retiradas do mesmo. A maior parte das bactérias clinicamente significativas são detetadas nos primeiros 3 dias de incubação (Bourbeau e Pohlman, 2001).

As garrafas são constituídas por um meio de cultura baseado em tripticase de soja complementado com aminoácidos complexos e hidratos de carbono, com o objetivo de suportar o crescimento de microrganismos e assegurar a produção ótima de CO₂. Cada

garrafa contém um sensor de CO₂, designado por sensor de emulsão líquida, que está separado do meio de cultura por uma membrana semipermeável. O sensor está impregnado em vapor de água durante a produção das garrafas. A membrana é impermeável à maioria dos iões, incluindo iões de hidrogénio, e a componentes do meio, bem como a produtos resultantes da degradação do sangue. É quase impermeável à água, mas é permeável a CO₂. Este CO₂ é produzido pelos microrganismos e difunde através da membrana em direção ao sensor e é dissolvido na água, gerando iões de hidrogénio de acordo com a equação: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$. Iões de hidrogénio livres podem interagir com o sensor, que é verde no seu estado alcalino (cultura negativa). À medida que o CO₂ é produzido e se dissolve na água, a concentração de iões de hidrogénio aumenta e o pH diminui. Isto faz com que o sensor se torne amarelo, o que resulta num aumento de luz vermelha refletida pelo sensor, indicando uma cultura positiva.

Cada poço contém um detetor colorimétrico. Estes detetores consistem num díodo emissor de luz vermelha e um fotodíodo que absorve luz vermelha. A luz emitida do díodo emissor é refletida pelo sensor para o fotodíodo, que produz um sinal de voltagem proporcional à intensidade da luz refletida e à concentração de CO₂ em cada garrafa. O equipamento analisa cada poço a cada 10 minutos. Depois de serem amplificados, os sinais de voltagem são digitalizados e transmitidos para um microcomputador para análise.

O equipamento BACT/ALERT analisa cada garrafa 144 vezes por dia. Cada garrafa é comparada consigo própria ao longo do tempo, em vez de ser comparada com um limite pré-estabelecido. Quando é detetado um aumento da concentração de CO₂ numa garrafa, a luz do poço acende-se e são registados vários dados, como o período de tempo até se ter chegado a um resultado positivo e a hora e data à qual se verificou que a garrafa estava positiva (Wilson *et al.*, 1995).

Cada meio possui ainda grânulos poliméricos adsorventes que permitem a neutralização da terapia antimicrobiana, assegurando melhores condições para o crescimento e deteção de microrganismos.

2.2. VITEK MS

Devido à utilização desadequada e prescrição abusiva de antibióticos, muitas bactérias tornaram-se resistentes aos antibióticos de primeira linha e mesmo a alguns de segunda linha, como é o caso das Enterobacteriaceae. As infeções causadas por estas bactérias, bem como o custo de terapias antimicrobianas de largo espectro, fazem com que haja uma necessidade real para a determinação rápida e exata da identificação de microrganismos.

A tecnologia MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight) usada pelo VITEK-MS examina o padrão de proteínas detetadas diretamente de bactérias intactas. A amostra a ser analisada é misturada com outro composto, designado por matriz. A mistura é aplicada a uma placa de metal e irradiada com um laser. A matriz absorve a luz do laser e é vaporizada, juntamente com a amostra, que no processo adquire uma carga elétrica, processo designado por ionização. Os iões resultantes são guiados por campos elétricos até ao espectrómetro de massa TOF, que os separa de acordo com o rácio massa/carga elétrica. No final a quantidade de cada ião é quantificada. A separação dos iões de acordo com este rácio resulta num perfil espectral de massa característico daquele microrganismo. A identificação dos microrganismos é baseada na comparação do espectro proteico gerado a partir de proteínas bacterianas intactas com uma base de dados de perfis proteicos específicos de proteínas usando um algoritmo proprietário (Hillenkamp *et al.*, 1991).

A técnica de MALDI-TOF utilizada no VITEK MS utiliza um algoritmo classificador de espectros original, isto é, há a comparação da presença e ausência de picos espectrais específicos entre o espectro obtido e o espectro típico de cada espécie em questão. Este algoritmo designa-se por ASC (advanced spectrum classifier). Consiste num método de aprendizagem supervisionado, que analisa dados espectrais e reconhece padrões, de modo a construir uma base de dados personalizada. Na maior parte dos casos, um padrão na base de dados corresponde a uma espécie. Por vezes, quando duas ou mais espécies não conseguem ser separadas eficientemente recorrendo a tecnologia MALDI-TOF, apenas um padrão é criado usando todos os espectros de todas as espécies envolvidas. Por outro lado, quando o espectro colhido de uma espécie é tão variável devido a variações próprias da estirpe ou devido a condições de cultura, como tempo de incubação e meio de cultura, são criados vários padrões para uma única espécie. Para cada espécie na base de dados, a variabilidade dos espectros é avaliada recorrendo a cálculos das distâncias interespetrais.

O algoritmo ASC compara os espectros obtidos com os espectros esperados para cada espécie ou grupo de microrganismos na base de dados de modo a fornecer uma identificação. Sendo assim, é calculada pelo algoritmo uma probabilidade em percentagem, ou valor de confiança, que representa a semelhança entre estes dois espectros em termos da presença ou ausência de certos picos específicos.

Apesar de todas estas vantagens, tais como a extrema rapidez da operação, permitindo obter resultados fiáveis em minutos, o rastreio de elevado rendimento e a facilidade de utilização, o operador deve permanecer atento na prática e durante a

preparação de amostras devido à reduzida distância entre os poços, especialmente em poços localizados junto do poço destinado à *Escherichia coli* de calibração (para a calibração do equipamento e para o controlo interno de identificação é usada a estirpe de *E. coli* ATCC [American Type Culture Collection] 8739), uma vez que pode haver a mistura accidental de duas amostras bacterianas, especialmente durante o passo da aplicação da matriz. Outra desvantagem é o facto deste sistema ainda não funcionar para fungos filamentosos e para micobactérias.

O sistema VITEK-MS permite uma aquisição rápida e confiável da identificação bacteriana para a maior parte das espécies bacterianas isoladas na rotina laboratorial, com recurso a apenas um depósito de colónias puras de bactérias e sem qualquer passo de extração prévio (Dubois *et al.*, 2012).

2.3. VITEK 2

O sistema VITEK 2 executa automaticamente todos os passos necessários para a identificação e para realização de TSA, depois da preparação e da padronização de um inóculo primário.

A identificação é feita com base em reações bioquímicas e a concentração mínima inibitória (CMI) é determinada com base num algoritmo que é aplicado à cinética do crescimento microbiano, monitorizado pelo sistema VITEK 2. O sistema deteta crescimento bacteriano e alterações metabólicas nos poços usando tecnologia que tem por base a fluorescência. Diferentes poços contêm diferentes antibióticos e diferentes substratos bioquímicos. Para a inoculação dos poços é necessário preparar uma suspensão de bactérias, retiradas de colónias puras, com uma turvação equivalente a 0.5 McFarland (Garcia-garrote e Cercenado, 2000).

Na análise da suscetibilidade antimicrobiana há duas possibilidades. Category agreement é a primeira. Neste caso, são determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) da bactéria em questão e esta é identificada como suscetível, resistente ou intermédia de acordo com critérios pré-determinados. A segunda possibilidade é quando ocorrem discrepâncias, havendo três tipos: erros muito graves, erros graves, erros menores. Erros muito graves acontecem quando o VITEK 2 indica a bactéria como suscetível, sendo esta resistente. Erros graves ocorrem quando o sistema indica a bactéria como resistente, sendo na realidade esta suscetível. Por fim, erros menores acontecem quando a bactéria é indicada como tendo suscetibilidade intermédia, sendo de facto ou resistente ou suscetível, ou vice-versa (Ligozzi *et al.*, 2002).

2.4. BACTEC MGIT 960

Nos últimos anos tem sido uma prioridade o desenvolvimento de métodos rápidos e fiáveis para a deteção de bacilos ácido-álcool resistentes a partir de culturas. As razões para esta priorização incluem o risco de saúde pública do reaparecimento de tuberculose, o aparecimento de estirpes multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* e a elevada incidência de infeções por *Mycobacterium avium* em doentes imunocomprometidos.

Embora tenha sido mostrado que uma variedade de métodos de biologia molecular têm o potencial de permitir uma deteção direta de *M. tuberculosis* a partir de amostras clínicas em poucas horas, a cultura de amostras continua a ser o “gold standard” a partir do qual é feito um diagnóstico definitivo de tuberculose.

O BACTEC MGIT 960 consiste num sistema completamente automatizado que utiliza a fluorescência de um sensor de oxigénio de modo a detetar o crescimento de micobactérias em meios de cultura. Este sensor de oxigénio emite fluorescência quando ocorre a redução de oxigénio induzida por bactérias aeróbias que se encontrem no meio de cultura.

O diagnóstico célere de infeções por micobactérias é crucial, pelo que quaisquer tentativas no sentido de diminuir o tempo para atingir esse diagnóstico merecem atenção. Este sistema mede continuamente a utilização de oxigénio, permitindo a deteção, sem demoras, do crescimento de micobactérias no meio líquido. Por fim, este sistema permite a incubação de até 960 meios de cultura (Tortoli *et al.*, 1999).

3. Amostras

O diagnóstico laboratorial de patologias causadas por bactérias requiere que a amostra apropriada seja colhida, entregue o mais rapidamente possível ao laboratório num meio de transporte adequado e que seja processada de uma forma que maximize a deteção dos patogénicos mais prováveis.

3.1. Sangue

As hemoculturas são dos procedimentos mais importantes realizados em laboratórios de microbiologia clínica, já que o sangue é um líquido estéril, e qualquer crescimento de microrganismos é sinal indicativo de infeção. O sucesso deste teste está diretamente relacionado com os métodos utilizados para colher a amostra de sangue. Devido ao facto da pele de muitos doentes hospitalizados ser suscetível de ser colonizada

por diversos microrganismos, é importante a desinfecção da pele do doente antes da colheita da amostra.

Os conceitos de bacteriemia e funguemia são definidos como a presença de bactérias e fungos no sangue, respectivamente, e estas infecções são referidas coletivamente como septicemias, que podem ser contínuas ou intermitentes. A septicemia contínua ocorre principalmente em doentes com infecções intravasculares ou quando há choque séptico, enquanto que a septicemia intermitente ocorre em doentes com infecções localizadas. No primeiro caso o intervalo de tempo no qual o sangue é colhido não é importante. Porém, na septicemia intermitente este fator já tem alguma importância, uma vez que o microrganismo não se encontra na corrente sanguínea de forma constante. Significa isto que, quando surgem os sinais clínicos de septicemia (febre ou arrepios, por exemplo), já se encontram poucos microrganismos na corrente sanguínea, encontrando-se estes no local onde se localiza a infecção. Assim, é recomendado que sejam colhidas 2 a 3 amostras de sangue a horas aleatórias durante um período de 24 horas. Alguns dos microrganismos que podem causar septicemia são a *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* e *Proteus spp.* (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

A maior parte das amostras de sangue são inoculadas diretamente em garrafas de hemocultura. Quando chegam ao laboratório, são colocadas de imediato no equipamento BACT/ALERT. Quando é detetado esse crescimento, as garrafas de hemocultura são repicadas para um meio de cultura de gelose de sangue (GS) e para uma lâmina, de modo a proceder-se a uma Coloração de Gram.

3.2. Líquido cefalorraquidiano (LCR)

A meningite bacteriana trata-se de uma doença grave que está associada a elevada mortalidade e morbidade, especialmente se o diagnóstico for tardio. Este é apenas um exemplo que demonstra que amostras de LCR devem ser processadas imediatamente após a colheita, não podendo ser refrigeradas ou colocadas num incubador. Assim que a amostra é recebida no laboratório é centrifugada durante 10 minutos a 2500 rpm, sendo o sedimento usado para inocular meios de cultura e para preparar uma Coloração de Gram. Os meios de cultura usados são a GS e o meio de cultura PoliViteX (PVX) e a pesquisa é orientada especialmente para *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, entre outros, se bem que o clínico deve ser notificado de imediato se for observado qualquer microrganismo, quer na Coloração de Gram, quer no meio de cultura, visto que o LCR normalmente é um fluido estéril.

A amostra é obtida por punção lombar, um ato médico, sendo a pele do doente desinfetada antes do processo ser iniciado. A amostra é colhida para dois tubos, sendo um utilizado nos testes bioquímicos e outro no exame microbiológico (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

3.3. Outros fluidos normalmente estéreis

Uma variedade de outros fluidos normalmente estéreis podem ser colhidos para cultura bacteriológica, incluindo fluido peritoneal, pleural, sinovial e pericardial. Infecções nestes locais do organismo estão associadas a uma grande variedade de microrganismos. Por esta razão, é importante a coloração de lâminas, como por exemplo a Coloração de Gram, de modo a auxiliar a identificação dos organismos responsáveis pela infecção. Estas amostras são também inoculadas em meios de cultura apropriados, de modo a posteriormente se proceder à identificação dos microrganismos responsáveis pela infecção e a TSA. A colheita destas amostras é efetuada com recurso a aspiração por agulha e seringa, para um contentor estéril, visto que uma zaragatoa não colheria quantidade suficiente de amostra, além de aumentar a probabilidade da existência de contaminantes na mesma (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

3.4. Urina

As amostras de urina são das mais frequentes num laboratório de microbiologia clínica. Durante a colheita da amostra o primeiro jato de urina deve ser descartado, devido às bactérias potencialmente patogénicas que colonizam a uretra, devendo a amostra consistir em apenas o jato intermédio de urina. Este tipo de amostra é normalmente colhida pelo próprio doente, havendo a necessidade de o instruir da forma correta de realizar a colheita. A amostra é colhida para um tubo estéril contendo ácido bórico como bacteriostático.

Assim que a amostra é recebida no laboratório, 1µL de urina é inoculado em cada meio de cultura, um meio de cultura GS e outro meio de cultura gelose CLED. Ambos os meios são depois incubados a 37°C durante 18h a 24h. Microrganismos que podem causar infeções urinárias incluem *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *S. aureus*, entre outros.

Após a incubação, ocorre uma análise quantitativa, na qual as amostras positivas correspondem àquelas que têm um número superior ou igual a 10⁵ UFC/mL (unidades formadoras de colónias). No entanto, nem todos os casos são tão lineares. Há que prestar

atenção à história clínica do doente e à suspeita do microrganismo presente no meio de cultura, entre outros (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

3.5. Fezes

A colheita da amostra deve ser feita em frascos de plástico de boca larga e estéreis. Em casos de suspeita de infeção parasitária devem ser feitas 3 colheitas em dias diferentes e alternados. O transporte da amostra deve ser o mais célere possível para evitar alterações acídicas nas fezes, devido ao metabolismo das bactérias pertencentes à flora intestinal, que podem ser tóxicas para alguns microrganismos. Se for antecipado qualquer tipo de atraso, a amostra deve ser colocada num meio de transporte adequado.

Se há a suspeita de algum tipo específico de patogénico entérico, é importante o laboratório ser notificado de tal, pois esta informação ajudará na escolha do meio de cultura mais apropriado. Além disso, alguns microrganismos não são isolados rotineiramente no laboratório. Mais, outros microrganismos não são encontrados numa amostra de fezes pois causam a doença através de uma toxina e não através do seu crescimento no trato gastrointestinal.

O exame cultural normal e de rotina de fezes é orientado para a pesquisa de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* e *Campylobacter spp.*. Compreende, em primeiro lugar, a utilização de um meio de enriquecimento para aumentar o número de microrganismos a isolar, como é o caso do caldo selenito, sendo depois usados meios seletivos, de modo a evitar o crescimento da flora normal, como o meio Hektoen, meio XLD, meio para isolamento *Yersinia spp.* e meio para isolamento *Campylobacter spp.* (Tille, 2013).

Devido ao facto de muitas bactérias estarem presentes nas fezes, patogénicas ou não, frequentemente são necessários pelo menos 3 dias para o isolamento e identificação do microrganismo (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

3.8. Exsudado vaginal

Infeções bacterianas do trato genital resultam em vários síndromes clínicos, incluindo vulvovaginite, úlceras vaginais, uretrites, cervicites, endometrites, e abscessos ováricos em mulheres.

Muitas amostras estão contaminadas com microrganismos pertencentes à flora normal da pele e das membranas mucosas. Contudo, microrganismos patogénicos como *Haemophilus ducreyi*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis* são sempre significativos.

Outros microrganismos, como *S. aureus*, apenas são patogénicos em determinadas situações clínicas. A origem da amostra, a quantidade relativa de patogénico em relação a outros microrganismos da flora normal do doente, e a interpretação da Coloração de Gram ajudam a determinar qual o microrganismo que necessita de ser identificado e submetido a TSA. Os laboratórios clínicos devem evitar isolar, identificar e realizar TSA a todos os microrganismos de todas as amostras. Além de representar custos excessivos, esta abordagem leva ao tratamento excessivo e desnecessário dos doentes.

Exemplos de identificação de microrganismos são a deteção de *N. gonorrhoeae* e *Streptococcus* do grupo B. Relativamente ao primeiro caso, a cultura para *N. gonorrhoeae* é ótima quando a amostra é diretamente inoculada num meio seletivo, como o meio para isolamento *Neisseria spp.*, e de imediato incubada. As zaragatoas contendo a amostra devem ser colocadas num meio de transporte contendo o meio de Stuart ou o meio de Amies, e devem ser transportadas para o laboratório o mais célere possível. As amostras para a pesquisa desta bactéria devem ser refrigeradas durante o transporte e tempos de transporte superiores a 24h são inaceitáveis.

Quanto ao segundo caso, mulheres grávidas colonizadas quer vaginal quer retalmente por *Streptococcus* do grupo B antes do parto têm um risco aumentado de infectar o recém-nascido durante o parto, pelo que necessitam de ser submetidas a profilaxia durante o mesmo. As recomendações atuais consistem na recolha de zaragatoas vaginais e rectais às 35 semanas, de modo a serem incubadas num meio de enriquecimento. Este meio é incubado a 35°C durante 18h a 24h, sendo subcultivado em GS e CNA no dia seguinte (Jorgensen *et al.*, 2015).

3.6. Amostras do aparelho respiratório inferior

As amostras do trato respiratório inferior são avaliadas de modo a determinar a etiologia da doença respiratória, como pneumonias ou abscessos pulmonares. As amostras habituais consistem em expetoração normal, expetoração induzida, aspirados brônquicos e lavados bronco-alveolares, bem como fluído pleural. *Streptococcus pneumoniae*, o microrganismo que mais frequentemente causa pneumonia bacteriana, é muito suscetível a condições *ex vivo* e pode não ser detetado em cultura se a amostra não for imediatamente processada.

Estas amostras são habitualmente colhidas para um frasco estéril de manhã, tratando-se da altura na qual a amostra é mais representativa e quando a probabilidade de

interferentes é menor, uma vez que durante a noite ocorre uma acumulação de secreções do trato respiratório.

Há muitas formas de avaliar a qualidade de amostras respiratórias. Um método simples envolve apenas a avaliação de células epiteliais e a avaliação de células de inflamação aguda. Estas células epiteliais encontram-se na orofaringe, mas não no trato respiratório inferior. A presença de elevados números de células epiteliais na amostra significa que houve contaminação da amostra com conteúdo orofaríngeo, que inclui microrganismos membros do microbiota oral. Amostras aceitáveis incluem numerosos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e raras células epiteliais. Isto significa que é necessário avaliar a qualidade da amostra aquando da sua chegada ao laboratório. Esta avaliação baseia-se na observação de uma Coloração de Gram de modo a verificar se efetivamente se trata de uma amostra representativa ou de uma amostra contaminada e que não deve ser processada. Na visualização ao microscópio da Coloração de Gram anteriormente efetuada, na objetiva de 10x, se forem visualizadas menos de 25 leucócitos e mais de 10 células epiteliais, a amostra não é processada visto que se encontra demasiado contaminada. No entanto, se forem observadas menos de 10 células epiteliais, pode concluir-se que se trata de uma amostra aceitável. Mais de 25 leucócitos significa que se está perante uma infeção. Com a conclusão de que se trata de uma amostra representativa, pode avançar-se com a inoculação dos meios de cultura, nomeadamente GS e PVX.

Deve ser reportada a presença de bactérias em colorações de Gram se se tratarem de potenciais patogénicos, como *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* e *Pseudomonas spp.*. As bactérias que não estão em quantidade suficiente ou cuja morfologia não corresponda àquela de patogénicos devem ser reportadas como pertencentes à flora normal.

As culturas de amostras provenientes do trato respiratório devem incluir um meio seletivo para bactérias Gram negativo, tal como o meio PVX, de modo a se poder proceder à deteção de *Haemophilus spp.*. Os meios de cultura devem ser incubados a 35°C com uma atmosfera capnófila antes de serem reportados como negativos. As culturas são interpretadas ao examinar os números relativos e os tipos de bactérias que cresceram no meio com a observação de uma Coloração de Gram (Jorgensen *et al.*, 2015).

3.7. Amostras do trato respiratório superior

As amostras do trato respiratório superior incluem amostras da nasofaringe, garganta, ulcerações orais e material inflamatório dos seios nasais. Embora poucas doenças

graves envolvem estas áreas, muitos microrganismos patogénicos colonizam ou persistem nestas áreas enquanto causam infeções sintomáticas em locais mais profundos.

As amostras da garganta são colhidas de modo a diagnosticar faringite. O agente etiológico mais comum é *Streptococcus pyogenes*. Contudo, outros *streptococcus* beta-hemolíticos, como *S. aureus*, bem como *N. gonorrhoeae*, também podem ocasionalmente causar faringite. As zaragatoas devem ser colocadas num meio de transporte contendo o meio de Amies ou o meio de Stuart modificado.

De modo a cultivar *streptococcus* do grupo A, tal como *S. pyogenes*, pode ser usado um meio de cultura com sangue e seletivo, como a GS. O meio seletivo faz com que o microrganismo seja mais fácil de visualizar ao inibir membros contaminantes da microbiota, mas pode atrasar o aparecimento de colónias de *S. pyogenes*. As culturas devem ser incubadas durante 48h a 37°C numa atmosfera capnófila.

As amostras da garganta também são usadas para identificar doentes infetados com *N. gonorrhoeae*. Para se obterem os melhores resultados, a amostra deve ser inoculada imediatamente num meio seletivo, tal como o meio para isolamento *Neisseria spp.*. As culturas devem ser incubadas a 37°C numa atmosfera capnófila durante 72h (Jorgensen et al., 2015).

Tabela 1 – Principais amostras recebidas no laboratório de microbiologia, bem como o respetivo procedimento de colheita, meios de cultura e microrganismos patogénicos mais frequentes.

Amostra	Colheita	Meio de cultura	Principais microrganismos patogénicos
Sangue	Colheita diretamente para frasco de hemocultura.	Incubação a 37°C até 5 dias. Se positivo, Coloração de Gram e repicagem para GS.	<i>Klebsiella spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Proteus spp.</i>
LCR	Colheita por punção lombar. Centrifugação após chegada ao laboratório.	Coloração de Gram, GS, PVX.	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
Urina	Colheita pelo doente do jato intermédio de urina para um contentor com ácido bórico.	GS, CLED. Incubação a 37°C durante 18h-24h.	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Fezes	Colheita para frascos estéreis de boca larga. Suspeita de parasitas – colheita em 3 dias diferentes e alternados.	Caldo selenito, Hektoen, XLD, Meio para isolamento <i>Yersinia spp.</i> e Meio para isolamento <i>Campylobacter spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i> <i>Shigella spp.</i> <i>Yersinia spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i>
Exsudado vaginal	Colheita com zaragatoa da zona vaginal em meio de transporte Stuart ou Amies.	Coloração de Gram, Meio para isolamento <i>Neisseria spp.</i> CNA.	<i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Streptococcus do grupo B</i>
Aparelho respiratório inferior	Colheita para um contentor estéril. Avaliar a qualidade da amostra – rejeitar se apresentar mais de 25 células epiteliais e menos de 10 leucócitos.	Coloração de Gram, GS, PVX. Micobactérias – Coloração de Ziehl-Neelsen, Löwenstein-Jensen e meio líquido (BACTEC MGIT).	<i>Bordetella pertussis</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Micobacterium spp.</i>
Aparelho respiratório superior	Colheita com zaragatoa na zona da orofaringe.	Coloração de Gram, GS, PVX.	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

4. Meios de cultura

Essencialmente existem dois tipos de meios de cultura: os meios não seletivos e enriquecidos, e os meios seletivos e diferenciais. Quanto aos primeiros, estes meios têm o objetivo de suportar o crescimento da maior parte dos microrganismos não fastidiosos. Os segundos são usados para a recuperação de microrganismos específicos que podem estar presentes numa mistura de outros microrganismos. Como se tratam de meios seletivos, são suplementados com inibidores que suprimem o crescimento de microrganismos que não estão em estudo. Para além de serem seletivos, estes meios também são diferenciais, pois contêm compostos específicos que permitem a identificação de um determinado microrganismo no meio de vários, como acontece quando é adicionada lactose para a identificação de microrganismos fermentadores de lactose (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

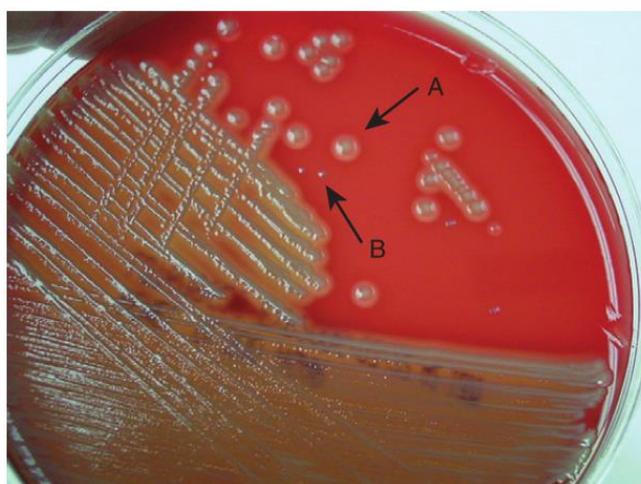


Figura 6 – Fotografia de uma gelose de sangue com crescimento de flora mista, constituída por bacilos Gram negativo de *Escherichia coli* (seta A) e cocos Gram positivo de *Enterococcus* spp. (seta B) (Tille, 2013).

4.1. Gelose de sangue (GS)

Nos laboratórios de microbiologia clínica são usados vários tipos de GS. Este meio contém dois componentes principais: um meio basal (tripticase de soja, brain heart infusion, etc.) e sangue (cabrito, cavalo ou coelho), além de que podem ser adicionados outros suplementos para aumentar o número de organismos que podem crescer no meio. O sangue que é adicionado é desfibrinado (sangue com a fibrina removida para prevenir a coagulação), permitindo, em certos microrganismos, observar a sua ação hemolítica (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013) (Ellner *et al.*, 1966).

4.2. Gelose chocolate (PolyViteX)

A gelose chocolate consiste numa GS modificada. Quando o sangue ou a hemoglobina é adicionada ao meio basal aquecido, o meio torna-se castanho devido à lise de eritrócitos (daí o nome). Esta lise celular leva à libertação de nutrientes intracelulares, como hemoglobina, hemina (fator X) e a coenzima nicotinamida adenina dinucleótida (fator V). Este meio suporta o crescimento da maior parte das bactérias, incluindo algumas que não crescem ou crescem muito pouco na gelose de sangue normal, como o *Haemophilus spp.* ou algumas estirpes patogénicas de *Neisseria spp.* (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013) (Tille, 2013).

4.3. CNA

O meio CNA consiste num meio nutricionalmente rico contendo 3 fontes de peptonas e 5% sangue desfibrinado de ovelha, que pode ser usado para diferenciar colónias com base na sua hemólise. CNA refere-se aos 2 antibióticos presentes: colistina e ácido nalidíxico, que são adicionados ao meio de modo a suprimir o crescimento da maior parte das bactérias Gram negativo, permitindo ao mesmo tempo o crescimento de bactérias Gram positivo, conferindo ao meio uma característica seletiva. A colistina atua na membrana das bactérias Gram negativas e o ácido nalidíxico impede a replicação do DNA (Tille, 2013).

4.4. Gelose Hektoen

A gelose Hektoen contém como inibidores sais biliares e como corantes azul de bromotimol e fucsina ácida, de modo a seletivamente atrasar o crescimento da maior parte dos bacilos Gram negativos não-patogénicos que se encontram no trato gastrointestinal e permitir o crescimento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. É um meio diferencial, visto que a maior parte das colónias dos bacilos não patogénicos que crescem neste meio terão uma cor laranja a salmão, que se deve devido à capacidade de fermentação de lactose destes bacilos. Esta fermentação leva a que o meio se torne mais ácido, levando a mudança de cor do azul de bromotimol. Nem a *Salmonella spp.* nem a *Shigella spp.* fermentam a lactose, pelo que não há mudança de cor das suas colónias, que mantêm a cor verde e azul do meio de cultura. O citrato férrico amoniacal, um indicador da deteção de H₂S, é um composto adicionado ao meio com o objetivo de o tornar diferencial. Os microrganismos produtores de H₂S, como é o caso da *Salmonella spp.*, aparecem assim com colónias contendo um precipitado negro (Tille, 2013).

4.5. Gelose Mueller-Hinton

A gelose Mueller-Hinton é o meio de cultura recomendado para realização de TSA, pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer. Este meio tem uma composição bem definida de extratos de caseína, catiões divalentes e amido solúvel, permitindo obter resultados reprodutíveis. O amido protege contra materiais tóxicos no meio, enquanto que a caseína e os catiões divalentes providenciam a energia e os nutrientes necessários (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013) (Haltiner, Migneault e Robertson, 1980).

4.6. Sabouraud

O meio Sabouraud é um meio enriquecido usado para o isolamento de fungos, que consiste em digeridos de caseína e tecido animal, sendo suplementado com glicose. Foram desenvolvidas uma variedade de formulações. No entanto, a maior parte dos micologistas usa a formulação com baixa concentração de glicose e pH neutro. Ao reduzir o pH e ao adicionar antibióticos para a inibição de bactérias, este meio pode ser tornado seletivo para fungos (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

4.7. XLD

O meio XLD é um meio seletivo e diferencial usado para a deteção de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* em culturas entéricas. O meio tem como constituintes extratos de levedura com xilose, lisina, lactose, sacarose, desoxicolato de sódio, tiosulfato de sódio, citrato férrico amoniacal, e vermelho de fenol. O desoxicolato de sódio inibe o crescimento da maior parte das bactérias não patogénicas, principalmente bactérias Gram positivo. As bactérias que efetivamente crescem no meio tipicamente fermentam a lactose, sacarose ou xilose, dando origem a colónias amarelas. A *Shigella spp.* não fermenta estes hidratos de carbono, pelo que as colónias permanecem incolores, ou melhor, permanecem da mesma cor que o meio de cultura. A *Salmonella spp.* fermenta xilose, mas também descarboxila a lisina, resultando num produto alcalino, a cadaverina. Isto resulta na neutralização dos produtos de fermentação ácida, pelo que as colónias também aparecem incolores. No entanto, pelo facto da *Salmonella spp.* possuir a enzima tiosulfato redutase, há a transformação de tiosulfato de sódio, parte constituinte do meio, em H₂S, que, reagindo com iões férricos, dá origem a sulfureto ferroso, um precipitado negro. Há assim uma diferenciação entre as colónias de *Salmonella spp.* e as colónias de *Shigella spp.* (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013) (Tille, 2013).

4.8. Meio Löwenstein-Jensen

O meio de Löwenstein-Jensen, usado para o isolamento de micobactérias, contém glicerol, fermento de amido, sais e ovos coagulados, de modo a solidificar o meio. Possui uma concentração moderada de verde de malaquite de modo a prevenir o crescimento da maior parte dos contaminantes que sobrevivem ao processo de homogeneização da amostra. O glicerol é usado como fonte de carbono e é favorável ao crescimento do bacilo da tuberculose humana, em detrimento da bovina. O meio deve ser protegido da exposição à luz enquanto decorre a incubação da cultura, visto que o verde de malaquite é muito fotossensível. A cor do meio vai desde um verde pálido a um verde e azul escuro. Os meios que se tornaram amarelos não devem ser usados, uma vez que a cor amarela interfere com a interpretação da pigmentação das micobactérias. A maior parte das bactérias contaminantes tornam o meio azul (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013) (Schaefer, 1952).

4.9. Meio para isolamento *Neisseria spp.*

O meio para isolamento *Neisseria spp.*, tradicionalmente conhecido como meio de Thayer-Martin modificado, é um meio seletivo e de enriquecimento para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, como o próprio nome indica. É um meio de enriquecimento devido à inclusão de sangue, e é um meio seletivo devido à adição de antibióticos, como a colistina, incluída para inibir outras bactérias Gram negativo, vancomicina, para inibir bactérias Gram positivo, e nistatina, para inibir o crescimento de leveduras. O antibiótico trimetoprim também é adicionado a este meio, de modo a inibir o *Proteus spp.*, que tende a criar um efeito de *swarming* por todo o meio de cultura, impedindo assim a deteção de colónias individuais de *Neisseria spp.* (Tille, 2013).

4.10. Gelose SS

O meio de cultura SS (*Salmonella*, *Shigella*) foi originalmente desenvolvido como um meio seletivo para o isolamento de espécies de *Salmonella* e *Shigella*, mas também com o objetivo de auxiliar a diferenciação de bactérias fermentadores de bactérias não fermentadores de lactose.

A diferenciação de espécies no meio de cultura SS baseia-se na fermentação de lactose e na absorção de vermelho neutro enquanto ocorre a precipitação de sais biliares no meio ácido. O vermelho de fenol torna-se, de facto, vermelho na presença de um meio ácido, mostrando assim que ocorreu fermentação. A inclusão de sais biliares e citrato de sódio serve para inibir o crescimento de microrganismos Gram positivo. A *Salmonella spp.* e

a *Shigella spp.*, bem como outros microrganismos não fermentadores de lactose, formam colónias transparentes ou translúcidas no meio de cultura. É adicionado ao meio tiosulfato de sódio para que, caso a bactéria possua a enzima tiosulfato redutase, haja a produção de H₂S. É também adicionado ao meio citrato férrico amoniacal como um indicador dessa produção (Tille, 2013).

4.11. Gelose CLED

O meio de cultura CLED é recomendado para o isolamento, enumeração e identificação presuntiva de patogénicos urinários tendo por base a fermentação da lactose. Não possui cloreto de sódio, o que ajuda a impedir o swarming de *Proteus spp.*. O meio é constituído por caseína, gelatina e extrato de carne, que fornecem azoto, vitaminas e carbono para suportar o crescimento microbiano. O meio é constituído também por lactose, que é a fonte de hidratos de carbono do meio, e o indicador de pH é o azul de bromotimol. Os microrganismos capazes de fermentar a lactose tornam o meio mais ácido, levando a que a cor do meio mude para amarelo. O meio CLED permite o crescimento da maioria dos potenciais patogénicos urinários, bem como uma variedade de contaminantes, como é o caso dos lactobacilos (Benner, 1970) (Mackey e Sandys, 1966).

4.12. Meio para isolamento *Yersinia spp.*

O meio para isolamento *Yersinia spp.*, tradicionalmente conhecido como meio YER/CIN, é um meio muito seletivo que permite isolar a *Yersinia enterocolitica*. As propriedades do meio são baseadas na natureza seletiva dos componentes, antibióticos, indicadores de pH e meio basal. É um meio muito seletivo inibindo o crescimento de *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* e *Streptococcus faecalis*. Os componentes seletivos do meio são desoxicolato de sódio, cefsulodina, irgasan e novobiocina. As colónias características de *Yersinia spp.*, colónias com um centro vermelho profundo com uma margem transparente, é importante para a identificação da espécie, e deve-se à presença de manitol. A *Yersinia enterocolitica* fermenta o manitol, produzindo um pH ácido, que providencia a característica marcante das colónias (Schiemann, 1979) (Schiemann, 1982).

5. Testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA)

O objetivo primário dos TSA é a determinação da possibilidade de o microrganismo em questão apresentar resistência ao agente antimicrobiano escolhido para o tratamento. Os resultados destes testes são importantes na escolha dos antibióticos a administrar ao doente numa determinada infeção.

Para controlar o impacto dos fatores ambientais, as condições dos testes são extensivamente padronizadas. Esta padronização tem 3 objetivos importantes: otimizar as condições de crescimento bacteriano, otimizar as condições para manter a integridade da atividade antimicrobiana e manter a consistência e a reprodutibilidade do perfil de resistência de um microrganismo, independentemente do laboratório que está a realizar o teste. Os procedimentos, orientações e recomendações para a realização de TSA estão detalhados nos documentos do EUCAST, ou, quando não o estão, nos documentos do CLSI. No entanto, apesar de todo este esforço, estes testes apenas representam o efeito do antibiótico no microrganismo sobre certas e determinadas condições. A seleção de um antibiótico e o resultado na infeção do doente são influenciadas por muitos fatores, incluindo as propriedades farmacocinéticas do antibiótico, a toxicidade do mesmo, a infeção em si e o estado geral de saúde do doente. Sendo assim, alguns microrganismos que no laboratório têm o resultado de suscetível serão na realidade resistentes, e inverso também poderá acontecer.

O uso de um inóculo padronizado é tão importante quanto a pureza das culturas que se usam e é conseguido comparando a turbidimetria de uma suspensão de um microrganismo com um padrão de turbidimetria. Para a generalidade das bactérias utiliza-se o padrão de turbidimetria 0.5 McFarland, que está comercialmente disponível, e que providencia uma densidade ótica equivalente à densidade de uma suspensão bacteriana com 1.5×10^8 UFC/mL. No laboratório de microbiologia do SPC usa-se um instrumento comercialmente disponível para a medição da turbidimetria de modo a padronizar o inóculo. Se a suspensão bacteriana não estiver a 0.5 McFarland, a suspensão ou pode ser mais diluída ou pode ser suplementada com mais microrganismos, consoante o caso.

No laboratório de microbiologia do SPC são realizados TSA automáticos, no aparelho VITEK 2, e TSA manuais. Relativamente aos TSA manuais, existem dois tipos: testes de difusão e testes de diluição. Nos testes de diluição são preparadas diluições sucessivas do antibiótico num meio de cultura que depois é inoculado com uma concentração padronizada da bactéria. No SPC este tipo de testes apenas são realizados a título experimental para avaliar a sensibilidade à colistina.

Nos testes de difusão a resistência antimicrobiana é detetada usando discos de papel impregnados com antibióticos e colocando-os à superfície de um meio de cultura sólido. O meio que é usado para a maioria dos microrganismos é o meio de Mueller-Hinton, se bem que para organismos mais fastidiosos é necessária a adição de certos suplementos.

Antes dos discos de antibióticos serem colocados no meio de cultura este deve ser inoculado com uma zaragatoa que foi submergida numa suspensão bacteriana padronizada com uma turbidimetria equivalente a 0.5 McFarland. A superfície do meio é inoculada em 3 direções diferentes de modo a assegurar-se a mais completa distribuição do inóculo.

Quando estes discos de papel contendo uma concentração conhecida de agente antimicrobiano são colocados à superfície de um meio de cultura sólido, o antibiótico começa imediatamente a difundir no meio de cultura, estabelecendo um gradiente de concentração em redor do disco de papel, fazendo com que a maior concentração seja aquela que se encontra mais perto do disco. Após incubação, as bactérias crescem a superfície do meio sólido, exceto nas áreas onde a concentração de antibiótico é suficientemente elevada para inibir o seu crescimento. Depois desta incubação, o diâmetro da zona de inibição em redor de cada disco é medido em milímetros.

As vantagens deste método são a sua facilidade e a sua conveniência. No entanto, uma das suas maiores desvantagens é a falta de critérios de interpretação para bactérias que não são encontradas com tanta frequência, além de não providenciar resultados mais exatos acerca da resistência ou suscetibilidade de um microrganismo a um determinado antibiótico.

Apesar de ainda se realizarem TSA manuais no laboratório de microbiologia, uma grande parte destes testes foram automatizados pelo aparelho automatizado VITEK 2. Uma desvantagem desta abordagem é, no entanto, que os antibióticos e a respetiva concentração são determinados pelo fabricante do equipamento (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013) (Tille, 2013).

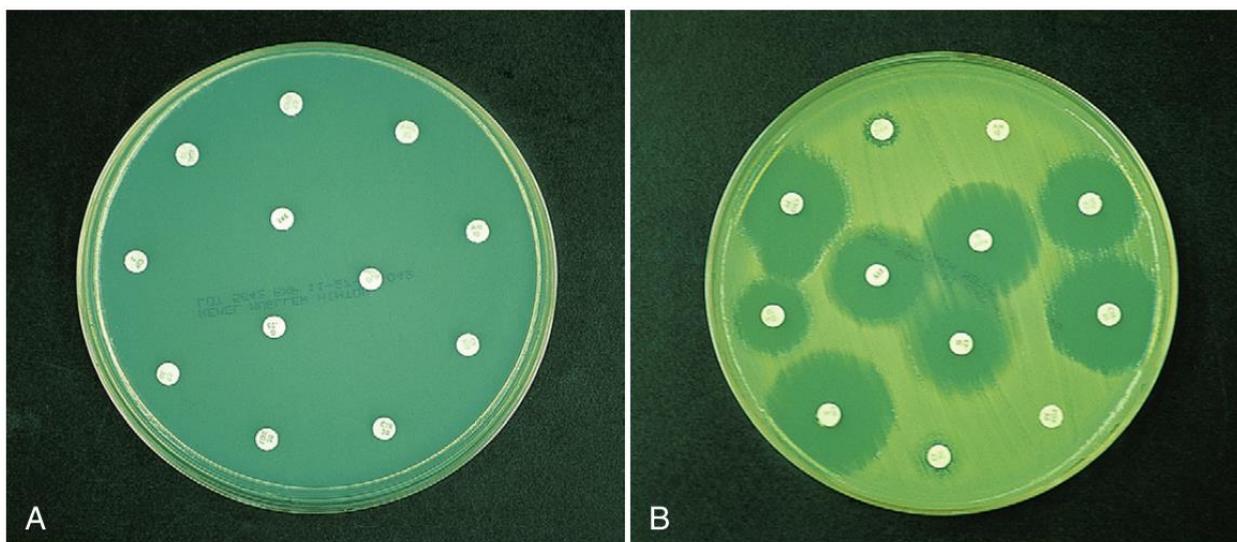


Figura 7 – Nesta figura é possível ver a realização do método de difusão. A – Os discos de antibióticos são colocados à superfície do meio de cultura após a respectiva inoculação com o microrganismo que está a ser testado. B – Após 16h a 18h de incubação é possível observar zonas de inibição do crescimento à volta de vários discos (Tille, 2013).

6. Micobactérias

As micobactérias são bacilos ácido-álcool resistentes, visto terem uma estrutura celular pouco habitual, com um conteúdo lipídico elevado, conteúdo esse constituído por ácidos micólicos. Estes ácidos criam uma barreira hidrofóbica e conferem várias características às micobactérias, fazendo com que cresçam mais lentamente que outras e permitindo que sobrevivam dentro de macrófagos, por exemplo. As micobactérias mais estudadas pertencem ao *Mycobacterium tuberculosis* complex. A inalação de apenas um bacilo viável pode levar a que se desenvolva uma infeção. É uma bactéria intracelular, capaz de estabelecer uma infeção contínua.

Quando é pedida a pesquisa de micobactérias no laboratório, as amostras que habitualmente são utilizadas são amostras do aparelho respiratório, como expetoração, aspirados brônquicos e lavados bronco-alveolares. O processo para a recuperação de bacilos ácido-álcool resistentes a partir de amostras clínicas envolve vários passos complexos, sendo que a maior parte das amostras requer um processo de descontaminação e concentração da amostra (homogeneização da amostra). Este processo é necessário de modo a eliminar ou reduzir bactérias contaminantes, que podem rapidamente sobrepor-se ao crescimento das micobactérias, de modo a libertar as micobactérias das células, e de modo a liquefazer a amostra. Se for encontrado um contaminante durante o processo de cultura, pode ser feita uma segunda homogeneização, mas nunca uma terceira. Depois deste processo as micobactérias são concentradas, habitualmente por centrifugação, com vista a aumentar a sua deteção por Coloração de Ziehl-Neelsen e por cultura.

Relativamente aos métodos de deteção direta, esta deteção pode ser feita por microscopia, sendo observada uma Coloração de Ziehl-Neelsen da amostra, ou então por observação de crescimento de colónias de *Mycobacterium spp.* em meio de cultura. Quanto à cultura, é usada uma combinação de meios de cultura com o objetivo de otimizar a recuperação de micobactérias; são utilizados um meio de cultura sólido e um meio de cultura líquido. O meio de cultura sólido que é utilizado no laboratório é o meio de Löwenstein-Jensen, incubado a 35°C com uma atmosfera capnofílica, e o aparelho automatizado BACTEC MGIT 960 é utilizado para a incubação de meios de cultura líquidos.

As culturas em meio sólido são examinadas uma vez por semana, e culturas positivas de *M. tuberculosis* costumam aparecer entre as 3 e as 8 semanas. É de notar que uma colónia pigmentada nunca deve ser confundida com *M. tuberculosis*, visto que se tratam de bactérias não fotocromogéneas. Depois de 8 semanas de incubação, se os meios de cultura não apresentarem crescimento de micobactérias, a amostra é reportada como negativa. Já a utilização de um meio de cultura líquido reduz o tempo médio de recuperação de bacilos ácido-álcool resistentes para cerca de 10 dias, em comparação com os 17 dias do meio sólido.

Quando uma cultura é positiva para micobactérias, o próximo passo deve ser sempre a identificação da espécie em causa. Independentemente dos métodos usados na identificação, deve sempre fazer-se em primeiro lugar uma coloração de bacilos ácido-álcool resistentes, tal como a Coloração de Ziehl-Neelsen, a partir da cultura em meio líquido e da cultura em meio sólido, de modo a confirmar se os microrganismos são efetivamente micobactérias.

Os métodos tradicionais de identificação de micobactérias, como os métodos fenotípicos, são baseados em parâmetros de crescimento, características bioquímicas, e análise dos lípidos da parede celular, sendo que todos estes métodos são lentos, incómodos e levam frequentemente a procedimentos inconclusivos.

A identificação da espécie é vital na seleção de uma terapia antimicrobiana eficaz. Sendo assim, para uma identificação exata e rápida de micobactérias, é usada uma conjugação de métodos moleculares com as características fenotípicas da colónia.

Quanto aos métodos de biologia molecular, atualmente a identificação de micobactérias por sequenciação baseada em PCR consiste na amplificação do DNA das micobactérias através da utilização de primers específicos e sequenciação de amplicões. O microrganismo é identificado por comparação da sequência nucleotídica com uma sequência

de referência. No entanto, por técnicas de PCR tradicionais não é possível distinguir espécies dentro do *M. tuberculosis* complex.

Apesar da precisão das técnicas de PCR na identificação de micobactérias, continuam a existir problemas; as sequências gravadas em algumas bases de dados não são corretas e existe uma certa falta de padronização nos procedimentos.

Por fim, sendo identificada a bactéria como pertencente ao *M. tuberculosis* complex, é necessário proceder-se a TSA, que são realizados diretamente no aparelho automatizado BACTEC MGIT 960. A tuberculose multirresistente é uma ameaça enorme à saúde pública, apresentando resistência à rifampicina e à isoniazida, os dois fármacos mais usados como um tratamento eficaz contra a tuberculose. Além destas estirpes multirresistentes, têm vindo a aparecer estirpes de tuberculose que são resistentes não só à rifampicina e à isoniazida, mas também a quinolonas e outros fármacos, como aminoglicosídeos.

Deve ser realizado um TSA no primeiro isolado de *M. tuberculosis* de todos os doentes. Este teste requer uma preparação meticulosa do meio de cultura, uma seleção adequada das colónias a testar, padronização do inóculo, uso de controlos apropriados e uma interpretação adequada dos resultados.

Os TSA podem ser realizados quer por métodos diretos quer por métodos indiretos. Os métodos diretos usam como inóculo um concentrado contendo mais do que 50 bacilos ácido-álcool resistentes por 100 campos observados com uma objetiva de imersão. O método indireto utiliza como cultura a fonte do inóculo. Embora os métodos diretos sejam capazes de providenciar resultados mais céleres, são menos padronizados e há um risco de ocorrer contaminação.

Os isolados iniciais de *M. tuberculosis* são testados contra 5 agentes antimicrobianos (rifampicina, isoniazida, estreptomicina, etambutol, pirazinamida). Se for detetada resistência a alguns destes fármacos, é testada uma segunda bateria de agentes antimicrobianos, tais como ciprofloxacina e rifabutina (Tille, 2013) (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

7. Micologia

As infeções fúngicas constituem uma ameaça cada vez maior para a saúde pública. O número de infeções nosocomiais e adquiridas na comunidade tem vindo a aumentar de forma dramática. O principal fator responsável por este aumento é o número cada vez maior de doentes imunocomprometidos. Estas alterações podem levar a infeções por microrganismos oportunistas, isto é, microrganismos que normalmente não são patogénicos, podendo mesmo pertencer à flora normal do doente. Outros fatores que levam a este aumento são os procedimentos cirúrgicos complexos e a terapêutica antibiótica.

O espectro de doenças fúngicas varia desde infeções superficiais cutâneas e mucosas até processos altamente invasivos associados a patogénicos classicamente sistémicos e oportunistas. Existem mais de 200.000 espécies de fungos, mas apenas 100 a 150 são reconhecidas como patogénicas para o ser humano, e destas só 25 são as responsáveis pela maior parte das infeções. A maior parte destes organismos são saprófitas.

As infeções habitualmente não são transmissíveis de pessoa a pessoa. Os seres humanos tornam-se hospedeiros acidentais para os fungos através da inalação de esporos ou através da introdução de tecido fúngico no organismo por trauma físico. O ser humano é relativamente resistente às infeções fúngicas, exceto quando se trata de uma infeção por um fungo dimórfico. As infeções clássicas aparecem agora sobre novas formas e os fungos que antigamente eram considerados inofensivos estão a ser implicados em doenças graves. A capacidade de os fungos normalmente saprófitas causarem doença em doentes imunocomprometidos significa que os laboratórios modernos precisam de ser capazes de identificar e reportar uma vasta gama de fungos.

Essencialmente existem dois tipos de fungos, com base no aspeto das suas colónias: fungos leveduriformes e fungos filamentosos. Porém, além destes dois tipos, existem também os fungos que apresentam as duas formas, isto é, que se encontram ou numa forma ou noutra, consoante várias condições atmosféricas, como a temperatura, obtendo assim a designação de fungos dimórficos.

O diagnóstico de infeções fúngicas depende, como todos os outros diagnósticos, da seleção e da colheita de uma amostra apropriada, de modo a proceder-se a uma análise microscópica e à cultura. Muitas infeções fúngicas têm o seu foco principal nos pulmões, pelo que são frequentemente usadas amostras do trato respiratório. Contudo, pode ocorrer também a disseminação da infeção para locais distantes do organismo, sendo que o microrganismo também pode ser recuperado de amostras não respiratórias.

Relativamente à cultura de fungos, não há um meio de cultura que seja capaz de isolar todos os fungos medicamente importantes, e é geralmente aceite que são necessários pelo menos dois tipos de meios, um seletivo e outro não seletivo. O meio não seletivo permite o crescimento de leveduras de crescimento rápido, bem como o crescimento de fungos mais fastidiosos e de crescimento mais lento. Além disso, é também recomendado a utilização de um meio de cultura com e sem ciclohexamida, bem como um meio com e sem um agente antibacteriano. Os meios com antibióticos são usados para amostras que têm alguma probabilidade de conter bactérias contaminantes, sendo que não são necessários para amostras estéreis. Embora a ciclohexamida não afeta fungos endêmicos e dimórficos, consegue inibir muitos patogénicos oportunistas, como *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*. Como estes fungos podem ser o agente etiológico da infeção, é também usado um meio complementar sem a adição deste composto.

Algumas amostras estão contaminadas com bactérias ou fungos de crescimento rápido, requerendo o uso de agentes antifúngicos e antibacterianos. A adição de ciclohexamida e de cloranfenicol aos meios tem sido o método tradicional de modo a inibir o crescimento destes contaminantes. No entanto, obtêm-se melhores resultados usando uma combinação de gentamicina e cloranfenicol, se bem que a ciprofloxacina também pode ser usada.

Os meios de cultura devem ser selados com fita permeável de modo a prevenir a desidratação. As amostras são geralmente incubadas durante duas semanas.

A examinação microscópica direta de amostras clínicas tem sido usada há já muitos anos, e nem por isso deve a sua eficácia e utilidade ser menosprezada; o laboratório de micologia consegue dar um diagnóstico rápido e exato usando este método. Além disso, este é o método mais rápido atualmente disponível.

Os fungos são identificados usando uma combinação do ritmo de crescimento, características morfológicas das colónias e características microscópicas. Para um fungo ser identificado com leveduriforme é necessário a observação de gemulação, de modo a não ser confundido com eritrócitos velhos, enquanto que para ser identificado como filamentosos é necessário a observação da zona onde se formam os conídios. Na maior parte dos casos estas características providenciam o meio mais definitivo de diagnóstico. Quanto ao ritmo de crescimento deve ser feita uma anotação; o ritmo de crescimento de um microrganismo é importante, podendo ser usado para determinar o tamanho máximo de uma colónia, mas deve ser interpretado em conjunção com outras características do microrganismo, como o tempo de cultura, antes de ser feita uma identificação definitiva. A cor de uma colónia

também é importante, sendo que o examinador deve ver tanto a parte da frente como a parte de trás da cultura. Deve ser feito exatamente o mesmo para a textura da colônia.

A identificação do gênero e da espécie do fungo, dependendo do tipo de fungo, requer estudos microscópicos mais detalhados de modo a delinear estruturas características. A identificação de fungos habitualmente requer testes bioquímicos e fisiológicos adicionais, enquanto que esta mesma identificação pode ser melhorada por caracterização molecular e imunológica (Tille, 2013) (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

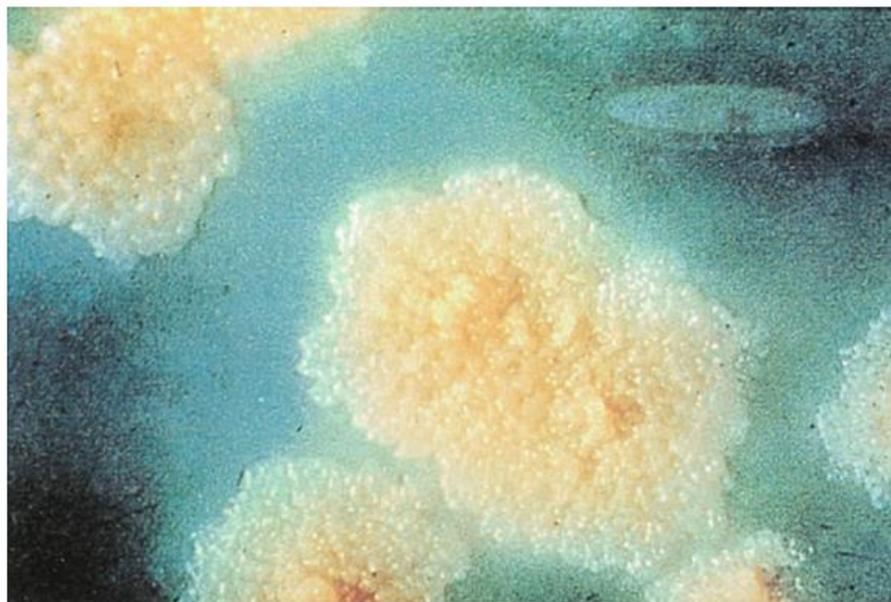


Figura 8 – Colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio de cultura Löwenstein-Jensen após 8 semanas de incubação (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013).

8. Parasitologia

O ramo da parasitologia é frequentemente associado a áreas tropicais. No entanto, muitos parasitas com a capacidade de infetar seres humanos distribuem-se mundialmente e ocorrem com alguma frequência em zonas temperadas. Além disso, um aumento no número de doentes imunocomprometidos tem levado ao aumento do interesse no ramo da parasitologia. Estes doentes têm um elevado risco de contrair algumas infeções parasitárias. Mais, estes doentes, incluindo a população muito jovem e muito idosa, podem reagir de modo diferente às infeções parasitárias. É importante entender o ciclo de vida dos parasitas, tanto em termos de potenciais medidas de controlo e prevenção, mas também em termos de progressão da doença em hospedeiros normais e imunocomprometidos.

As amostras que mais frequentemente chegam ao laboratório com o pedido de pesquisa de parasitas são as fezes e o sangue. Relativamente ao exame parasitológico de

fezes, aquando da chegada da amostra ao laboratório, deve ser realizado um exame macroscópico, onde se notam as características das fezes, tais como textura, aspeto, consistência, presença de muco ou sangue, bem como a presença de parasitas macroscópicos ou fragmentos de parasitas.

Feito o exame macroscópico, deve proceder-se ao exame microscópico das fezes. Este pode ser feito de forma direta ou após a realização de um método de concentração, como é o caso do método de Ritchie. As fezes contêm numerosos artefactos que complicam a diferenciação de parasitas do resto dos detritos. Um método de concentração tem o objetivo de aumentar a probabilidade de encontrar ovos, quistos ou larvas, particularmente em amostras onde o microrganismo está presente em quantidades demasiado pequenas para ser observado por microscopia direta. Estes métodos consistem no emprego de formaldeído como fixador e éter como solvente, de modo a extrair lípidos e detritos, seguido de uma filtração e centrifugação (Manser, Saez e Chiodini, 2016).

Tanto por uma forma como por outra, para a observação microscópica é necessário a colocação de uma amostra de fezes entre lâmina e lamela, sendo a amostra observada primeiro com a objetiva de 10x e depois com a de 40x. É vital que toda a lâmina seja observada. A objetiva de 10x serve para observar estruturas maiores, como ovos, larvas ou seres adultos. Já a objetiva de 40x serve para estruturas parasitárias de menor tamanho, como é o caso dos quistos.

Quanto ao exame parasitológico de sangue, este é realizado quando se suspeita de parasitas sanguíneos, como é o caso do *Plasmodium spp.* e do *Trypanossoma spp.*. A pesquisa de parasitas deve ser feita em duas preparações diferentes: um esfregaço sanguíneo e uma gota espessa. Na examinação de um esfregaço sanguíneo a observação inicial deve ser feita com a objetiva de 10x, devendo a lâmina inteira ser percorrida com esta objetiva. A parte final do esfregaço sanguíneo deve ser especialmente observada para a pesquisa de parasitas intracelulares e extracelulares, visto que nesta área a morfologia e o tamanho dos glóbulos vermelhos que possam estar parasitados é mais facilmente visível. Antes de um esfregaço sanguíneo ser reportado como negativo, devem ser examinados um mínimo de 300 campos. Relativamente à gota espessa, a maior concentração de células sanguíneas encontra-se no centro da lâmina. A procura de microrganismos responsáveis pela malária, bem como tripanossomas, deve ser feita com uma objetiva de imersão 50x e 100x. Na periferia da lâmina observam-se glóbulos vermelhos intactos. Estas células, se estiverem infetadas, podem ajudar no diagnóstico da malária.

O diagnóstico laboratorial de infecções parasitárias também pode ser efetuado por métodos serológicos, se bem que este diagnóstico tenha algumas particularidades. Embora os parasitas sejam imunogénicos para os hospedeiros, a resposta imunitária do hospedeiro não costuma ser protetora. A imunidade do hospedeiro é habitualmente específica para uma espécie e pode de igual modo ser específica para uma estirpe ou mesmo para um estado de desenvolvimento do ciclo de vida do microrganismo parasitário. Os parasitas humanos são geralmente divididos em dois grupos: aqueles que se multiplicam no hospedeiro e aqueles que maturam no hospedeiro sem que ocorra a sua multiplicação. Em infecções do primeiro tipo, também chamadas de infecções protozoárias, à medida que a infeção progride ocorre uma estimulação antigénica contínua do sistema imunitário do hospedeiro. Nestes casos existe uma correlação positiva entre os sinais clínicos e os resultados dos testes serológicos. Em contraste com os protozoários, os helmintas migram frequentemente através do organismo do hospedeiro e passam através de um número de estados de desenvolvimento até chegarem ao estado adulto. Estas infecções são difíceis de diagnosticar através de testes serológicos devido a uma resposta antigénica limitada pelo hospedeiro. A maior parte dos antígenos parasitários usados em procedimento serológicos são misturas heterogéneas não definidas, e por vezes, não específicas, pelo que os resultados de testes serológicos podem ser inválidos devido a reações cruzadas ou fraca sensibilidade (Tille, 2013).

Conclusão

Este estágio assumiu, desde logo, uma grande importância na minha formação académica, possibilitando-me um contacto direto com profissionais de saúde altamente qualificados que trabalham na área há imenso tempo. Pude assim aprender várias técnicas laboratoriais que me acompanharão no futuro, assim que ingressar no mercado de trabalho. Foi o culminar de uma aprendizagem substancialmente teórica, ao longo de cinco anos de percurso académico, que não poderiam ter terminado de melhor forma.

A minha experiência ao longo do estágio permitiu-me que ganhasse uma nova perspetiva sobre a área da saúde e o próprio funcionamento do sistema: apercebi-me da grande conexão que os vários sectores estabelecem entre si, sendo que o que acontece num afeta todos.

A exigência que me foi imputada ao longo dos seis meses de estágio, sobretudo ao nível da prática laboratorial, contribuiu, indubitavelmente, para desenvolver o meu sentido de responsabilidade, concentração, dedicação, organização e resiliência.

Não poderia ter efetuado o meu estágio curricular em melhor estabelecimento. Sinto-me muito mais capaz para enfrentar o futuro que se avizinha.

Em relação ao trabalho de pesquisa, foi fundamental para consolidar toda a prática a que estive sujeito ao longo deste caminho e assumiu a oportunidade de aprofundar temas importantes, que têm implicação direta no dia-a-dia dos profissionais de saúde.

Referências Bibliográficas

BENNER, E. J. - **Simple disposable method for quantitative cultures of urine.** Applied microbiology. ISSN 0003-6919. 19:3 (1970) 409–412.

BOURBEAU, Paul P.; POHLMAN, Janice K. - **Three Days of Incubation May Be Sufficient for Routine Blood Cultures with BacT / Alert FAN Blood Culture Bottles Three Days of Incubation May Be Sufficient for Routine Blood Cultures with BacT / Alert FAN Blood Culture Bottles.** Journal of clinical microbiology. 39:6 (2001) 2079–2082. doi: 10.1128/JCM.39.6.2079.

BURMESTER, Gerd; PEZZUTTO, Antonio - **Color Atlas of Immunology.** 1st. ed. : Thieme, 2003. ISBN 3131267410.

BURTIS, Carl A.; BRUNS, David E. - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry And Molecular Diagnostics.** 7th. ed. : Elsevier, 2015. ISBN 9788578110796.

CARRER, D. LE; BOUCRAUT, J. - **Urine protein electrophoresis and immunofixation: illustrated interpretations.** 1st. ed. : Issy-le-Moulineaux: Sebia Laboratories, 1999

DETRICK, Barbara; HAMILTON, Robert G.; SCHMITZ, John L. - **Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology.** 8th. ed. : Amer Society for Microbiology, 2016. ISBN 9781555818715.

DUBOIS, Damien *et al.* - **Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology.** Journal of Clinical Microbiology. ISSN 00951137. 50:8 (2012) 2568–2576. doi: 10.1128/JCM.00343-12.

ELLNER, P. D. *et al.* - **A new culture medium for medical bacteriology.** American journal of clinical pathology. England. ISSN 0002-9173. 45:4 (1966) 502–504.

GARCIA-GARROTE, Fernando; CERCENADO, Emilia - **Evaluation of a New System , VITEK 2 , for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci.** J Clin Microbiol. 38:6 (2000) 2108–2111.

HAGE, Marianne Van; HAMSTEN, Carl; VALENTA, Rudolf - **ImmunoCAP Assays: pros and cons in allergology.** Journal of Allergy and Clinical Immunology. ISSN 0091-6749. 2017). doi: 10.1016/j.jaci.2017.05.008.

HALTINER, R. C.; MIGNEAULT, P. C.; ROBERTSON, R. G. - **Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton agar with low thymidine content.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. ISSN 0066-4804. 18:3 (1980) 365–368.

HILLENKAMP, Franz *et al.* - **Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers.** Analytical Chemistry. ISSN 15206882. 63:24 (1991). doi: 10.1021/ac00024a716.

JORGENSEN, James H. *et al.* - **Manual of Clinical Microbiology.** ISBN 9781555816780.

KEREN, David F. - **Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis.** 1st. ed. : Arnold Publication, 2003. ISBN 9780340812136.

KHOSROSHAHI, Arezou; STONE, John H. - **A clinical overview of IgG4-related systemic disease.** Current opinion in rheumatology. United States. ISSN 1531-6963. 23:1 (2011) 57–66. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283418057.

KYLE, R. A.; RAJKUMAR, S. V - **Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma.** Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K. ISSN 0887-6924. 23:1 (2009) 3–9. doi: 10.1038/leu.2008.291.

LIGOZZI, Marco *et al.* - **Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci**
Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-. Journal of clinical microbiology. 40:5 (2002) 1681–1686. doi: 10.1128/JCM.40.5.1681.

MACKEY, J. P.; SANDYS, G. H. - **Diagnosis of Urinary Infections.** British Medical Journal. ISSN 0007-1447. 1:5496 (1966) 1173.

MANSEER, Monika M.; SAEZ, Agatha Christie Santos; CHIODINI, Peter L. - **Faecal Parasitology: Concentration Methodology Needs to be Better Standardised.** PLoS Neglected Tropical Diseases. ISSN 19352735. 10:4 (2016) 1–16. doi:10.1371/journal.pntd.0004579.

MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R. - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.** 23rd. ed. : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680.

MURRAY, David L. *et al.* - **Laboratory persistence and clinical progression of small monoclonal abnormalities.** American journal of clinical pathology. England. ISSN 1943-7722. 138:4 (2012) 609–613. doi: 10.1309/AJCPT6OWWMHITAIY.

- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. - **Medical Microbiology**. 7th. ed. : Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN 978-0-323-08692-9.
- OCHS, Hans D.; SMITH, C. I. Edvard; PUCK, Jennifer M. - **Primary immunodeficiency diseases : a molecular and genetic approach**. 2nd. ed. : Oxford University Press, 2007. ISBN 9780195147742.
- SCHAEFER, Werner B. - **Growth requirements of dysgonic and eugonic strains of Mycobacterium tuberculosis var. Bovis**. The Journal of Experimental Medicine. ISSN 0022-1007. 96:3 (1952) 207–219.
- SCHIEMANN, D. A. - **Synthesis of a selective agar medium for Yersinia enterocolitica**. Canadian journal of microbiology. Canada. ISSN 0008-4166. 25:11 (1979) 1298–1304.
- SCHIEMANN, D. A. - **Development of a two-step enrichment procedure for recovery of Yersinia enterocolitica from food**. Applied and Environmental Microbiology. ISSN 0099-2240. 43:1 (1982) 14–27.
- SCHMIDT, Stephen D. *et al.* - **Abeta measurement by enzyme-linked immunosorbent assay**. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). United States. ISSN 1940-6029. 849:2012) 507–527. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_34.
- STEVENS, Cristine D. - **Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective**. 3rd. ed. : F.A. Davis Company, 2009. ISBN 9780803618145.
- TILLE, Patricia - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 13th. ed. : Mosby, 2013. ISBN 0323083307.
- TORTOLI, Enrico *et al.* - **Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens : Multicenter Study**. 37:11 (1999) 3578–3582.
- TURGEON, Mary Louise - **Immunology and Serology in Laboratory Medicine**. 5th. ed. : Elsevier, 2013. ISBN 9780323085182.
- WILSON, M. L. *et al.* - **Controlled evaluation of BacT/Alert standard anaerobic and FAN anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia and fungemia**. Journal of Clinical Microbiology. ISSN 0095-1137. 33:9 (1995) 2265–2270.