



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Joana Inês Esterlita Tabuaço

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela Silva e Dra. Alice Mendes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2018

Joana Inês Esterlita Tabuaço

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em
Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Gabriela
Silva e Dra. Alice Mendes e apresentado à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra**

Setembro 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Agradecimentos

O estágio curricular e a escrita do presente relatório, constituíram para mim um desafio na minha vida profissional e pessoal, sendo que, este espaço é dedicado a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta etapa.

A toda a equipa do Centro Hospital e Universitário de Coimbra, em especial à Dr^a. Alice Mendes e à Dr^a. Cristiana Canha, pela forma como me acolheram e me orientaram durante todo o tempo de estágio, pela disponibilidade e paciência. Muito obrigada!

À Professora Doutora Gabriela Silva pela disponibilidade prestada.

À minha mãe e à minha madrinha, pelo exemplo de mulheres que constituem para mim, pelos valores que me transmitiram e a educação que me deram!

Ao meu pai e ao meu irmão, pela disponibilidade que sempre tiveram e por me ajudarem sempre que podiam!

Ao meu namorado, por ser o meu pilar e caminhar de mãos dadas comigo, pela paciência e dedicação!

À família RAJA e a todos os meus amigos que de alguma forma estiveram comigo quer física quer emocionalmente!

Índice

Abreviaturas.....	v
Índice de Tabelas.....	vii
Resumo	xi
1. Introdução.....	1
2. Caracterização do local de estágio.....	1
3. Atividades desenvolvidas	3
3.1 Secção Laboratorial de Microbiologia	3
3.1.1 Laboratório de Bacteriologia	5
3.1.2 Laboratório de Micobactérias.....	30
3.1.3 Laboratório de Parasitologia	35
3.1.4 Laboratório de Virologia.....	41
3.2 Secção Laboratorial de Imunologia	43
3.2.1 Laboratório de Imunologia	43
3.2.2 Laboratório de Autoimunidade.....	51
4. Conclusão.....	63
5. Bibliografia.....	65

Abreviaturas

AMA: Anticorpos anti-mitocôndrias

ANA: Anticorpos antinucleares

ANCA: Anticorpos anti-citoplasma de granulócitos

ASMA: Anticorpos anti-músculo liso

BAAR: Bacilos ácido-álcool resistentes

BGN: Bacilo Gram Negativo

CBP: Cirrose Biliar Primária

CEP: Colangite esclerosante primária

CGP: Coco Gram Positivo

CMI: concentração mínima inibitória

ELIZA: Ensaio Imunoenzimáticos

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEIA: *Ensaio imunoenzimático fluorescente*

HAI: hepatite Autoimune

IFI: Imunofluorescência indireta

Ig: Imunoglobulina

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LKMI: anticorpos anti-microsomas renais e hepáticos

MGUS: gamopatias monoclonais de significado indeterminado

MPO: Mieloperoxidase

PR3: Proteinase 3

RLUS: Unidades de luz relativa

StaNeg: Estafilococos coagulase negative

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

UTI: Infecção do Trato Urinário

Índice de Tabelas

Tabela 1: Pressupostos das fases Pré-Analítica, Analítica e Pós-Analítica.	4
Tabela 2: Tipos de amostras e respetivos sistemas de transporte mais frequentes no laboratório de microbiologia.....	5
Tabela 3: Preparações Microscópicas e Colorações utilizadas no Laboratório de Bacteriologia Clínica.	6
Tabela 4: Meios de enriquecimento mais utilizados no laboratório de Bacteriologia.....	8
Tabela 5: Meios seletivos e/ou diferenciais mais utilizados no Laboratório de Bacteriologia.....	9
Tabela 6: Técnicas de sementeira mais utilizadas no Laboratório de Bacteriologia.	11
Tabela 7: Morfologia das colónias em meio sólido em placa.....	12
Tabela 8: Cartas de Suscetibilidade Antimicrobianas utilizadas no VITEK® 2.	16
Tabela 9: Processamento laboratorial da amostra de urina colhida por micção.....	18
Tabela 10: Modo de ação perante uroculturas negativas e positivas.....	18
Tabela 11: Modo processamento de amostras de fezes.	20
Tabela 12: Modo de atuação perante uma garrafa de hemocultura que já perpez o tempo de incubação.....	21
Tabela 13: Modo de ação perante amostras, que com garrafas de hemocultura positivas, resultam em culturas positivas ou negativas.	21
Tabela 14: Modo processamento de cateteres.....	22
Tabela 15: Modo processamento LCR.....	22
Tabela 16: Modo processamento de liquido pleural.....	23
Tabela 17: Modo processamento de liquido peritoneal e sinovial.....	24
Tabela 18: Infecções do trato respiratório superior mais frequentes e os respetivos agentes etiológicos bacterianos (Tabela adaptada Mahon <i>et al.</i> , 2014).	24
Tabela 19: Infecções do trato respiratório inferior mais frequentes e os respetivos agentes etiológicos bacterianos (Tabela adaptada Mahon <i>et al.</i> , 2014).....	25
Tabela 20: Processamento de expetorações e aspirados transtraqueais.	26
Tabela 21: Processamento de Lavados Brônquicos e Bronco-alveolares.....	26
Tabela 22: Classificação de amostras do trato respiratório, baseado na observação microscópica da coloração de Gram, pelo laboratório de bacteriologia dos CHUC.	26
Tabela 23: Valorização das colónias obtidas e orientação do diagnóstico de acordo com a observação do Gram e da informação clínica do paciente.	27

Tabela 24: Processamento de Exsudados purulentos.	27
Tabela 25: Microrganismos frequentemente envolvidos em infecções da pele e tecidos moles. (Quadro adaptado Washington, 1981).	28
Tabela 26: Espécies bacterianas mais frequentemente pesquisadas no laboratório de bacteriologia e respetiva patologia associada(Fonseca, Bruschy Ana, Sebastião, Clotilde, Ribeiro Carvalho, Maria Graça V., Calheiros, Ismália, Lito, Luis, Abecassis, Margarida, Pinto, Margarida, Spencer, Maria Odete, Pinheiro, Maria Paula, Costa, Maria Teresa, Barros, Rosa Maria, e Bento, Rosa Fula, 2004).....	29
Tabela 27: Processamento de exsudados genitais.....	29
Tabela 28: Meios de cultura e respetivas incubações utilizados no Laboratório de Micobactérias.....	32
Tabela 29: Testes moleculares de identificação mais utilizados no laboratório de Micobactérias.....	33
Tabela 30: Parasitas intestinas encontrados em fezes.....	36
Tabela 31: Técnicas utilizadas para pesquisa de parasitas em amostras de fezes.....	37
Tabela 32: Parasitas intestinais observados após técnicas de concentração-sedimentação (Figuras adaptadas de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018)	37
Tabela 33: <i>Cryptosporidium parvum</i> observado após técnica de coloração de Kinyoun. (Figura adaptada de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018).....	38
Tabela 34: Espécies mais frequentemente observadas em hemoparasitoses.	39
Tabela 35: Técnicas utilizadas para pesquisa de parasitas em amostras de sangue.....	39
Tabela 36: Parasitas do sangue observados em esfregaços finos e , esfregaços de gota espessa após coloração com Giemsa (Figuras adaptadas de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018).	40
Tabela 37: Parasitas sanguíneos observados em esfregaços de sangue de gota espessa corados com Giemsa (Figuras adaptadas de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018).	40
Tabela 38: Equipamentos utilizados no laboratório de virologia.....	41
Tabela 39: Agentes etiológicos virais rotineiramente pesquisados e o método de diagnóstico utilizado.	42
Tabela 40: Equipamentos utilizados na determinação dos parâmetros Imunoquímicos no laboratório de imunologia.....	43
Tabela 41: Parâmetros analisados pelos Equipamentos BN II e BN ProSepc.....	43
Tabela 42: Modificações observadas nas frações como consequência de situações patológicas.....	45
Tabela 43: Tipos gamapatias classificadas de acordo com critérios imunoquímicos.....	47
Tabela 44: Tipos de gamapatias classificadas de acordo co critérios clínicos.	48
Tabela 45: Doenças autoimunes sistémicas, sistema de órgãos envolvidos e imunopatologia.	52

Tabela 46: Doenças autoimunes específicas de órgão, envolvimento típico e imunopatologia.	53
Tabela 47: Exemplos de padrões de ANA's observados por IFI (Figuras adaptadas de (Wiik, Allan S., Høier-Madsen, Mimi, Forslid, Jan, Charles, Peter, e Meyrowitsch, Jan, 2010)).	55
Tabela 48: Exemplos de imunofluorescências positivas e negativas na pesquisa de autoanticorpos anti-dsDNA utilizando o substrato de <i>Crithidia luciliae</i> (Figuras adaptadas Gerlach et al., 2015).....	56
Tabela 49: Alguns anticorpos determinados por quimiluminescência e doenças associadas.	59

Resumo

No âmbito do Estágio Curricular, decorrido no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, ao abrigo do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizou-se o relatório de estágio com o objetivo de, em primeiro lugar, consolidar os conhecimentos obtidos durante todo o mestrado, mas principalmente durante o estágio e, em segundo lugar, dar a conhecer quais as atividades desenvolvidas. No presente relatório, consta a caracterização do Laboratório e a descrição das atividades desenvolvidas, com especial detalhe para as duas valências escolhidas: Microbiologia Clínica e Imunologia Clínica.

Palavras-chave: Relatório de Estágio, Laboratório, Análises Clínicas, Microbiologia, Bacteriologia, Parasitologia, Micobactérias, Imunologia, Eletroforese de Proteínas, Imunoensaios.

Abstract

In the scope of the Curricular Internship, held in the Hospital Center of the University of Coimbra, under the Master of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, the internship report was carried out with the objective of consolidating the knowledge obtained during the entire masters degree, but mainly during the internship and, secondly, to make known the activities developed. In this report, there is the characterization of the Laboratory and the description of the activities developed, with special detail for the two valencies chosen: Clinical Microbiology and Clinical Immunology.

Keywords: Report, Stage, Laboratory, Clinical Analysis, Microbiology, Bacteriology, Parasitology, Mycobacteria, Immunology, Protein Electrophoresis, Immunoassays.

1. Introdução

No âmbito do Estágio Curricular do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra realizei um estágio que teve início a dia 8 janeiro de 2018 e fim a 6 de julho de 2018 no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

Este estágio teve como principais objetivos a aquisição de experiência prática e a aquisição de competências científicas e técnicas relativas às 4 valências principais: Bioquímica Clínica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia. O tempo de estágio por estas valências dividiu-se ordenadamente da seguinte forma: 6 semanas na Bioquímica Clínica, 6 semanas na Microbiologia, 5 semanas na Imunologia, 2 semanas na Serologia infecciosa, 5 semanas na Hematologia. A divisão de tempo e a sequência foram realizadas consoante a disponibilidade dos setores relativamente a pessoal, a volume de trabalho e a mudanças estruturais no laboratório.

Apesar de durante todo o tempo de estágio ter integrado de forma ativa na rotina laboratorial e ter participado na interpretação e validação de resultados relativas a todas as valências, o presente relatório apenas aborda de forma mais profunda os temas das áreas de Microbiologia e da Imunologia que pude observar e participar. O relatório contém ainda uma breve caracterização do local de estágio.

2. Caracterização do local de estágio

O Serviço de Patologia Clínica do CHUC é dirigido pelo Patologista Clínico Dr. Fernando Rodrigues e é composto por 3 laboratórios: o laboratório do edifício São Jerónimo situado no Hospital Universitário de Coimbra (HUC), o Laboratório do Hospital Geral (HG) e o laboratório do Hospital Pediátrico (HP). Estes 3 laboratórios prestam apoio ao HUC, HG, HP, Maternidade Bissaya Barreto, Maternidade Daniel de Matos e ainda outras instituições públicas e privadas com as quais o CHUC tem protocolos de colaboração. O fluxo de amostras dentro das instituições é assegurado por um sistema pneumático, e entre as diferentes instituições é assegurado por um transporte automóvel que leva as amostras em horários pré-definidos e também consoante as necessidades.

O laboratório do Edifício São Jerónimo no HUC é o laboratório principal e é onde se realiza a maioria das análises do Serviço de Patologia Clínica. Foi aqui que se desenvolveu a maioria do estágio. Estruturalmente o laboratório localiza-se no 3º e 4º pisos do edifício São Jerónimo. No 4º piso (Figura 1) existe uma sala de colheitas, sala de espera, zona de receção de produtos, salas de armazenamento de reagentes e produtos, salas de lavagem e esterilização de material, secretaria, sala de reuniões, sala de refeições e 4 secções

laboratoriais: a secção de Química Clínica e a secção de Hematologia (incluídas no core-Lab), a secção da Imunologia, Autoimunidade e Alergologia e a secção da Microbiologia. Estas secções laboratoriais estão apoiadas cada uma delas por gabinetes de validação onde Médicos Patologistas Clínicos e Técnicos Superiores de Saúde cooperam com o objetivo de transmitir rapidamente resultados fiáveis e assim prestar um serviço de qualidade aos seus utentes. O core-Lab é uma grande secção que contém uma zona de receção e integração de amostras. Possui equipamentos que prestam apoio na distribuição das amostras pelos diversos sectores e nas determinações dos parâmetros Bioquímicos, Hematológicos e Serológicos, e ainda uma cadeia para determinação dos parâmetros de urgência que funciona 24h/dia. O seu funcionamento é assegurado por Assistentes Operacionais, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, Técnicos Superiores de Saúde e Patologistas Clínicos.

No 3º piso do Edifício existe uma área para citometria de fluxo e para técnicas de biologia molecular apoiados por salas de validação.

Relativamente às secções laboratoriais em específico, a secção da Química Clínica determina os parâmetros da bioquímica de rotina e de urgência, da função endócrina e marcadores tumorais; A secção da Hematologia determina parâmetros do hemograma, da coagulação e citologia, citogenética, FISH, biologia molecular e citometria de fluxo; A secção da Imunologia determina os parâmetros da imunidade geral, alergia, autoimunidade e serologia infecciosa e finalmente a secção da Microbiologia que engloba os Laboratórios de bacteriologia, parasitologia, micobactéria e micologia.

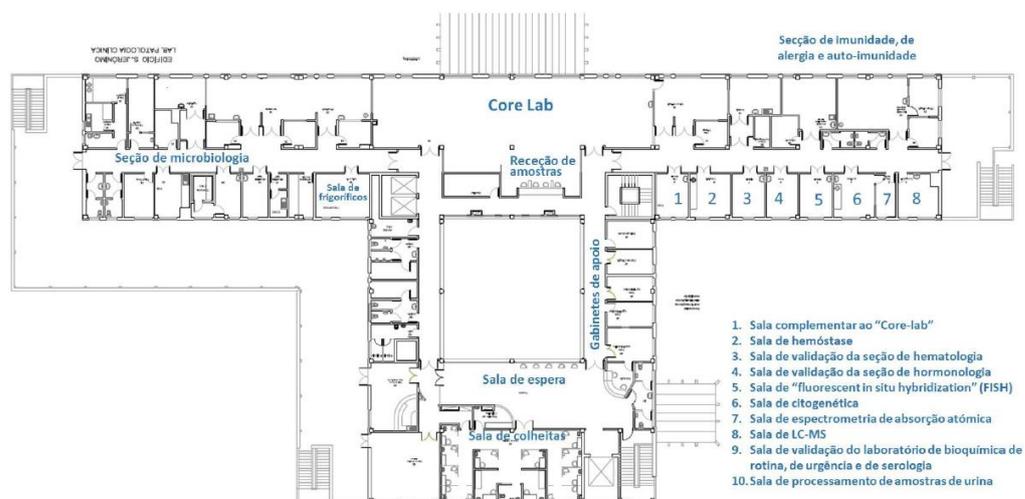


Figura I - Planta do 4º Piso do Edifício São Jerónimo.

3. Atividades desenvolvidas

De modo geral, as atividades desenvolvidas ao longo de cada uma das 4 valências: Bioquímica Clínica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia, visaram sempre a aquisição de experiência prática e novos conhecimentos teóricos e a sua aplicação. Em termos práticos foi possível a integração e a consequente perceção do funcionamento da rotina de um laboratório, a consciencialização de que tendo em conta o volume de amostras e a quantidade de parâmetros pedidos é cada vez mais necessário a automatização do serviço e a estratificação de funções de forma a manter uma organização funcional equilibrada do laboratório. Para além do trabalho de bancada, tive a possibilidade de assistir e participar na validação de resultados onde conceitos teóricos, adquiridos durante a frequência nas cadeiras de mestrado, se tornaram mais claros. O contacto com diagnóstico e acompanhamento de doentes com determinadas patologias tornou evidente de quais as doenças mais comuns nos dias de hoje, quais as populações e as faixas etárias mais afetadas, e qual o procedimento mais correto na orientação do diagnóstico de forma a transmitir sempre um resultado de confiança no menor tempo possível e a baixo custo.

3.1 Secção laboratorial de Microbiologia

A secção laboratorial de Microbiologia engloba os laboratórios de Bacteriologia, de Parasitologia e de Micologia. Estruturalmente o laboratório possui uma sala para a receção das amostras onde é verificada a viabilidade e a integração, possui salas onde se efetua o processamento da amostra e onde se encontram os aparelhos auxiliares anexos ao diagnóstico microbiológico, uma sala de microscópios, uma sala de arrumos, uma sala de refrigeração e estufas e ainda gabinetes de validação.

O diagnóstico microbiológico envolve a identificação, classificação e caracterização de espécies possivelmente causadoras de doenças infecciosas e é constituído por 3 grandes fases: a fase Pré-analítica, a fase Analítica e a fase Pós-Analítica (Tabela I) (Winn, Washington C., Alen, Stephen D., Janda, William M., Koneman, Elmer W., Procop, Gary W., Schreckenberger, Paul C., e Woods, Gail L., 2006).

Tabela 1: Pressupostos das fases Pré-Analítica, Analítica e Pós-Analítica.

Fases do diagnóstico	Pressupostos
Fase Pré-Analítica	<ol style="list-style-type: none"> 1) Diagnóstico Presuntivo 2) Colheita e identificação da amostra 3) Transporte 4) Receção e Registo da amostra
Fase Analítica	<ol style="list-style-type: none"> 1) Observação macroscópica da amostra 2) Exame microscópico da amostra 3) Cultura da Amostra 4) Identificação do agente e testes de suscetibilidade
Fase Pós- Analítica	<ol style="list-style-type: none"> 1) Transmissão de resultado 2) Administração da Terapêutica

Colheita e transporte da amostra

Para que o diagnóstico tenha sucesso é necessário rigor na colheita e no transporte da amostra. A amostra deve ser entregue rapidamente ao laboratório num sistema de transporte adequado (Tabela 2). É de extrema importância que a amostra venha devidamente identificada e acompanhada com informação clínica pertinente. A entrega da amostra ao laboratório e o seu processamento deve ser o mais breve possível de forma a maximizar a deteção dos prováveis agentes patogénicos (Fonseca, Bruschy Ana, Sebastião, Clotilde, Ribeiro Carvalho, Maria Graça V., Calheiros, Ismália, Lito, Luis, Abecassis, Margarida, Pinto, Margarida, Spencer, Maria Odete, Pinheiro, Maria Paula, Costa, Maria Teresa, Barros, Rosa Maria, e Bento, Rosa Fula, 2004). Se algum destes parâmetros for violado, a amostra deve ser imediatamente rejeitada, desta forma há a garantia da viabilidade de todas as amostras que entram no laboratório, assim como a fiabilidade dos resultados obtidos.

Tabela 2: Tipos de amostras e respectivos sistemas de transporte mais frequentes no laboratório de microbiologia

AMOSTRA	SISTEMA DE TRANSPORTE
Urina	Tubo coletor estéril com ácido bórico
Fezes	Frasco coletor estéril com tampa de rosca com ou sem espátula Zaragatoa de Copan
Zaragatoas genitais	Zaragatoa de Copan
Sangue	Frasco de Hemocultura
Líquido cefalorraquidiano	Frasco estéril
Outros líquidos: Pleural, Sinovial, Peritoneal	Contentores estéreis de rosca ou frascos porta gérmen
Secreções Respiratórias: Expetoração, Secreções Brônquicas: Aspirado Transtraqueal, Lavado Brônquico e Lavado Bronco-Alveolar	Contentor estéril com tampa de rosca. Zaragatoas
Exsudados Purulentos: Zaragatoas e Aspirados de feridas, Aspirados de pus de abcesso, Material de tecidos e biópsias.	Zaragatoa de Deltalab Frasco porta gérmen Contentores estéreis com tampa de rosca

3.1.1 Laboratório de Bacteriologia

No laboratório de Bacteriologia os principais objetivos são o crescimento, o isolamento, a identificação e a determinação da suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* do ou dos microrganismos presentes na amostra que são os possíveis causadores de doença. O crescimento dos microrganismos tem por base a inoculação da amostra em meios de cultura adequados ao tipo de amostra e ao tipo de microrganismo possivelmente presente, de forma a conseguir obter colónias isoladas: cultura *in vitro*. Em paralelo à cultura *in vitro* realizam-se esfregaços de amostras para observação microscópica que se tornam muito úteis para o laboratório e para o clínico na orientação do diagnóstico e administração de terapia empírica. A identificação é efetuada maioritariamente no sistema automatizado VITEK[®] MS, ou pelo sistema VITEK2, ambos a partir de colónias isoladas. No entanto, a identificação também pode ser feita através da pesquisa de sequências específicas de ácidos nucleicos. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) são efetuados maioritariamente pelo sistema automatizado VITEK[®] 2, exceto para algumas espécies para as quais o sistema não está validado em que se realizam testes de suscetibilidade manuais.

3.1.1.1 Diagnóstico Laboratorial

I. Microscopia da Amostra

Em geral a microscopia é utilizada em duas funções básicas : i) na detecção e identificação preliminar de microrganismos; ii) na identificação definitiva de microrganismos. A visualização de propriedades morfológicas características pode ser utilizada para a identificação preliminar da maioria das bactérias e pode também ser utilizada na identificação definitiva de muitos fungos, parasitas e inclusões virais características em células infetadas (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

As preparações Microscópicas e Colorações mais utilizadas no Laboratório de Bacteriologia Clínica dos CHUC são o exame direto e a Coloração de Gram (Tabela 3).

Tabela 3: Preparações Microscópicas e Colorações utilizadas no Laboratório de Bacteriologia Clínica.

MÉTODO	PRINCIPIOS E APLICAÇÕES
EXAME DIRETO:	<p>Exame a fresco:</p> <p>Numa lâmina, a amostra é suspensa em soro fisiológico ou em água, a preparação é coberta com uma lamela.</p> <p>Este é o método mais simples de visualização ao microscópio no qual é possível a detecção e distinção de bactérias e fungos. Nos laboratórios, este método torna-se útil quando as características morfológicas observadas em cultura são duvidosas relativamente à presença de leveduras ou bactérias.</p>
COLORAÇÕES DIFERENCIAIS	<p>Coloração de Gram:</p> <p>O método baseia-se no uso de um corante primário, violeta de cristal, a descoloração com álcool-acetona e a contra-coloração com safranina ou fuscina diluída. As bactérias Gram positivo coram de roxo e as Gram negativo de vermelho. É a coloração mais utilizada no laboratório de microbiologia clínica, constituindo a base para a separação dos dois principais grupos de bactérias (Gram positivas e Gram negativas), as suas formas (bacilos, cocos, leptospira, vibrião) e tipos de agrupamento (diplo, estafilo, estrepto, téttrada, paliçada etc). (Fonseca, Bruschy Ana, Sebastião, Clotilde, Ribeiro Carvalho, Maria Graça V., Calheiros, Ismália, Lito, Luis, Abecassis, Margarida, Pinto, Margarida, Spencer, Maria Odete, Pinheiro, Maria Paula, Costa, Maria Teresa, Barros, Rosa Maria, e Bento, Rosa Fula, 2004; Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014). Além disso através desta técnica consegue-se quantificar a presença ou a ausência de determinadas células e classifica-las consoante a importância para o diagnóstico (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013). Esta técnica torna-se muito útil no laboratório na orientação do diagnóstico, e para o Clínico para exclusão inúmeras possibilidades e administração terapia empírica.</p>

II. Cultura in vitro

A cultura *in vitro* é umas das formas de diagnóstico mais utilizadas no laboratório de microbiologia. Tendo em conta a diversidade de microrganismos, as suas necessidades

específicas de crescimento e a forma como estes se distribuem nos diferentes tipos de amostras, torna-se evidente a necessidade da adequação dos meios de cultura para que se obtenha sucesso no diagnóstico.

Outro fator importante para o sucesso do diagnóstico usando o método de cultura *in vitro* é a técnica utilizada para preparar o meio (Fonseca, Bruschy Ana, Sebastião, Clotilde, Ribeiro Carvalho, Maria Graça V., Calheiros, Ismália, Lito, Luis, Abecassis, Margarida, Pinto, Margarida, Spencer, Maria Odete, Pinheiro, Maria Paula, Costa, Maria Teresa, Barros, Rosa Maria, e Bento, Rosa Fula, 2004). O laboratório de microbiologia compra os meios de cultura sólidos já preparados e mantém-os refrigerados até ao dia da sua utilização. Já os meios de cultura líquidos são hidratados no laboratório consoante as indicações do fabricante.

Os meios de cultura podem ser classificados em 3 categorias gerais: i) meios enriquecidos não seletivos; ii) meios seletivos; iii) meios diferenciais, podendo ser líquidos, semilíquidos ou sólidos (Fonseca, Bruschy Ana, Sebastião, Clotilde, Ribeiro Carvalho, Maria Graça V., Calheiros, Ismália, Lito, Luis, Abecassis, Margarida, Pinto, Margarida, Spencer, Maria Odete, Pinheiro, Maria Paula, Costa, Maria Teresa, Barros, Rosa Maria, e Bento, Rosa Fula, 2004).

i. Meios de enriquecimento não seletivos

Esses meios são concebidos para permitir o crescimento da maioria dos organismos que não necessitam de requerimento nutricional adicional (Tabela 4) (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

ii. Meios Seletivos

Meios seletivos são utilizados para o isolamento de organismos específicos que podem estar presentes conjuntamente com outros organismos. Os meios são suplementados com substâncias que inibem o crescimento de organismos indesejados. Alguns meios seletivos são também diferenciais (Tabela 5) (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

iii. Meios diferenciais

Os meios são diferenciais pela adição de ingredientes específicos que permitem a diferenciação de organismos com base nas suas características metabólicas específicas (Tabela 5) (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

Tabela 4: Meios de enriquecimento mais utilizados no laboratório de Bacteriologia.

Estado	Designação e Aplicação
Líquido	<p>BHI : Brain Heart Infusion</p> <p>Meio não seletivo de enriquecimento usado no cultivo de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos, incluindo bactérias aeróbicas e anaeróbicas, podendo ser utilizado como meio base para hemoculturas (Fonseca, Bruschy Ana, Sebastião, Clotilde, Ribeiro Carvalho, Maria Graça V., Calheiros, Ismália, Lito, Luis, Abecassis, Margarida, Pinto, Margarida, Spencer, Maria Odete, Pinheiro, Maria Paula, Costa, Maria Teresa, Barros, Rosa Maria, e Bento, Rosa Fula, 2004).</p>
	<p>CM: Caldo Cooked Meat</p> <p>Meio de enriquecimento rico em proteínas usado para favorecer o crescimento de anaeróbios (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>
Sólido (com 1,5% de agar)	<p>GS: Gelose de Sangue</p> <p>Meio de enriquecimento não seletivo. O meio contém dois componentes primários: um componente básico (p. ex. tripticase de soja) e sangue esterilizado (p. ex., de ovelha, cavalo ou coelho) (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014). É usado para isolamento, cultivo e detecção de atividade hemolítica de alguns microrganismos e outros microrganismos fastidiosos ((Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>
	<p>Meio de Muller-Hinton</p> <p>Meio não seletivo principalmente utilizado para a realização dos testes de suscetibilidade antimicrobianos de rotina (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). Apresenta uma composição bem definida de extratos de caseína e carne, sais, catiões divalentes e amido solúvel necessário para que haja reprodutibilidade dos (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).</p>
Sólido (com 1,5% de agar)	<p>Gelose Chocolate base</p> <p>A gelose de Chocolate é um meio enriquecido não seletivo obtido através do aquecimento a 80°C da gelose de sangue convencional, o que faz com que haja a hemólise dos eritrócitos (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). É utilizada no cultivo e isolamento de microrganismos fastidiosos, especialmente espécies de <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i> (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014). Na sua base contém nutrientes como caseína, peptonas e tampão fosfato. A suplementação do meio com sangue providencia hemoglobina a qual provê o fator X (Hemina) necessário para o crescimento de espécies de <i>Haemophilus</i> e para o favorecimento de <i>Neisseria</i>. A suplementação com Iso VitaleX providencia o Fator V (nicotinamida adenina dinucleótido –NAD), para o crescimento de <i>Haemophilus</i>. Outras vitaminas, aminoácidos, coenzimas, dextrose e iões de ferro que melhoram o crescimento de espécies patogênicas de <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i> (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>
	<p>PVX: Gelose de Chocolate com Piridoxal</p> <p>Este meio é de enriquecimento pela adição de piridoxal à gelose chocolate base. O piridoxal é a vitamina B6 componente que é necessário para o crescimento de certas espécies de <i>Streptococcus</i>, <i>Haemophilus</i> e outros microrganismos fastidiosos (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>
Líquido	<p>Meio de Cultura BacT/ALERT® FAN® Plus</p> <p>Este meio de cultura consiste em garrafas que contêm no fundo sensores de emulsão líquida sensíveis ao pH. Após a inoculação do sangue nestas garrafas e do seu transporte para o laboratório, são introduzidas no aparelho BACT/ALERT® 3D. Os sensores contidos na garrafa mudam visualmente de cor quando o pH se altera devido ao aumento de CO₂ produzido pelos microrganismos. O aparelho mede essa mudança de cor de cinza para amarelo através da luz refletida. O instrumento mede a produção de CO₂ colorimetricamente sem precisar entrar na garrafa (Kirn, T. J., Mirrett, S., Reller, L. B., e Weinstein, M. P., 2013; Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).</p>

Tabela 5: Meios seletivos e/ou diferenciais mais utilizados no Laboratório de Bacteriologia

Estado	Designação e Aplicação
Sólidos (com 1,5% de agar)	CLED: Meio Cistina, Lactose Deficiente em Eletrólitos Meio não seletivo e diferencial utilizado especialmente para o isolamento, enumeração e identificação presuntiva de microrganismos presentes na urina (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009). A deficiência de eletrólitos inibe o “swarming” de <i>Proteus spp.</i> e a presença de lactose permite diferenciar os fermentadores dos não fermentadores (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004).
	Meio MacConkey Meio seletivo e diferencial para isolamento de bacilos Gam negativo (BGN) (<i>Enterobacteraceae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> etc.) (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009). Contém sais biliares e violeta de cristal que inibem o crescimento da maioria das Gram positivo. A presença de lactose permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004), uma vez que a produção de ácido resultante da fermentação da lactose leva à mudança de cor do indicador de pH vermelho-neutro (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).
Sólidos (com 1,5% de agar)	HAE: Gelose de Chocolate com Bacitracina Este meio é seletivo pela adição da bacitracina à gelose chocolate base. A bacitracina inibe as bactérias Gram positivo e a maioria das <i>Neisseria</i> favorecendo indiretamente o crescimento de <i>Haemophilus spp.</i> nos produtos com flora mista (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004), (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).
	Gelose de Martin-Lewis Meio seletivo para o cultivo e isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . É um meio obtido a partir da gelose de chocolate base suplementado com Colistina, Vancomicina, Anisomicina e Trimetoprim (VCAT). A Colistina inibe as bactérias Gram negativo, a vancomicina as Gram positivo, o trimetoprim que inibe o swarming do <i>Proteus</i> , e a anisomicina que inibe o crescimento de <i>Candida albicans</i> (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).
Sólidos (com 1,5% de agar)	Gelose de Campylobacter Meio seletivo para o cultivo e isolamento de espécies de <i>Campylobacter</i> a partir de amostras de fezes. O meio é suplementado com sangue de carneiro que suporta o crescimento das espécies de <i>Campylobacter</i> , contém ainda peptonas, dextrose e extrato de leveduras. A incorporação de agentes antimicrobianos (anfotericina B, Cefalotina, Polimixina B, Trimetoprim e Vancomicina) suprimem o crescimento das espécies da flora fecal, facilitando o isolamento de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).
	Gelose de MacConkey com Sorbitol Meio seletivo e diferencial para a detecção do serotipo de <i>E.coli</i> O157:H7 não fermentadora de sorbitol. Este meio torna-se diferente do meio de MacConkey original porque contém sorbitol em vez de lactose. A <i>E. coli</i> O157:H7 não fermenta o sorbitol, aparecendo transparentes no meio, ao contrário das restantes bactérias fecais que aparecem de cor de rosa (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).
Sólidos (com 1,5% de agar)	CNA: Gelose sangue, Colistina e Acido Nalidíxico O meio é seletivo e diferencial para a isolamento e diferenciação de bactérias Gram positivas. Contém colistina e o ácido nalidíxico que inibem o crescimento de Gram negativas, como algumas <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Pseudomonas spp.</i> (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004).

<p>Sólidos (com 1,5% de agar)</p>	<p>Meio Hektoen</p> <p>Meio seletivo e diferencial para o cultivo e isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). Os sais biliares inibem as Gram positivo e retardam o crescimento de algumas enterobactérias. Contém lactose, sacarose e salicina que na presença do indicador de pH fucsina e o azul de bromotimol possibilita a diferenciação de espécies entéricas patogênicas através da cor das colónias e do meio adjacente. O citrato férrico amoniacal e o tiossulfato de sódio presentes no meio possibilitam a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio, evidenciado por colónias de centro negro. Especialmente importante para a diferenciação entre espécies de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> (Zimbrow, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>
<p>Sólidos (com 1,5% de agar)</p>	<p>Meio SS: Salmonella e Shigella</p> <p>Meio seletivo e diferencial para isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). Os sais biliares, o verde brilhante e o citrato inibem Gram positivas e algumas enterobactérias. A diferenciação de microrganismos entéricos é feita pela adição de lactose ao meio. Microrganismos que fermentam lactose produzem ácido, que na presença do indicador de vermelho neutro, resulta em colónias vermelhas. O citrato férrico amoniacal e o tiossulfato de sódio presentes no meio possibilitam a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio, evidenciado por colónias de centro negro permitindo a diferenciação de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> (Zimbrow, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>
<p>Líquido</p>	<p>CBGN: Caldo Bacilo Gram negativo</p> <p>Meio de enriquecimento seletivo para <i>Shigella spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i> (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004)</p> <p>O manitol e a dextrose estão presentes no meio como fontes de energia. O manitol está presente em maior concentração para favorecer o crescimento de microrganismos que fermenta o manitol assim, promove seletivamente o crescimento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> que o metabolizam, e limita o crescimento de <i>Proteus spp.</i> e outros microrganismos fermentadores de dextrose (Zimbrow, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009). O citrato e o desoxicolato atuam como agentes seletivos e inibem o crescimento da maioria das <i>Enterobacteriaceae</i> da flora habitual do intestino, todos os tipos de bacilos formadores de esporos e algumas Gram positivas.</p> <p><i>Proteus</i>, <i>Pseudomonas</i> e outros coliformes não crescem neste meio nas primeiras 6 horas, por isso é importante que a repicagem para meio sólido seja feita antes desse tempo. (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004).</p>
<p>Sólidos (com 1,5% de agar)</p>	<p>Meio CIN</p> <p>Meio seletivo e diferencial suplementado com Cefsulodina e Novobiocina utilizado para isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i>. O meio é diferencial devido à presença de manitol, que quando fermentado, na presença de vermelho neutro resulta em colónias “bull’s-eye”, descoradas mas com centro vermelho. O violeta de cristal, desoxicolato e Irgasan inibem seletivamente as Gram positivas e Gram negativas. A suplementação com Cefsulodina e novobiocina inibe o crescimento os microrganismos da flora gastrointestinal (Zimbrow, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>
<p>Sólidos (com 1,5% de agar)</p>	<p>Meio ANA gelose de sague 5% Carneiro + Vancomicina + Canamicina</p> <p>É um meio seletivo para o isolamento de bacilos Gram negativos anaeróbios. O meio consiste numa gelose convencional suplementada com L-cisteína e ditiotritol e uma redução de hemina e vitamina K o que fornece nutrientes necessários ao cultivo de anaeróbios.</p> <p>A adição de agentes antimicrobianos como a vancomicina e a canamicina facilitam a recuperação de bacilos Gram negativos anaeróbios obrigatórios presentes em amostras de flora mista, uma vez que estes antibióticos inibem o crescimento de bactérias Gram positivas anaeróbias facultativas e obrigatórias (Zimbrow, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>

Meio de Sabouraud dextrose

É um meio seletivo utilizado para cultura e isolamento de fungos, especialmente dermatófitos.

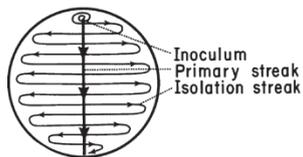
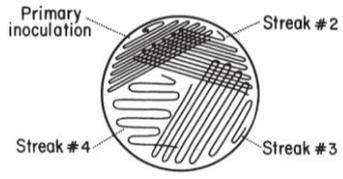
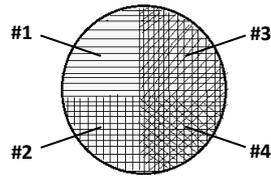
A adição de dextrose ao meio de Sabouraud providência nutrientes necessários para o crescimento de fungos. O meio torna-se seletivo pela adição de antimicrobianos e pela redução de pH. A gentamicina inibe o crescimento de bactérias Gram negativo. O clorafenicol inibe um grande espectro de Gram negativas e Gram positivas. O antifúngico ciclohexamida inibe o crescimento de fungos saprófitas mas não o crescimento leveduras e dermatófitos. O pH de 5,6 que é favorável ao crescimento de fungos, nomeadamente dermatófitos, e inibe o crescimento de bactérias contaminantes presentes nas amostras (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014; Zimbardo, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).

Sólidos
(com 1,5%
de agar)

iv. Técnicas de sementeira

A técnica de sementeira é determinante para o sucesso da cultura *in vitro* e deve ser executada de acordo com o tipo de amostra e o objetivo final.

Tabela 6: Técnicas de sementeira mais utilizadas no Laboratório de Bacteriologia.

MEIO DE CULTURA	SEMENTEIRA	FINALIDADE	ESQUEMA
Meios sólidos em placa	Quantitativa	Quantificar o número de colónias obtidas. A inoculação é feita com uma ansa calibrada (0,01mL) (Washington, John A., 1981).	
	Esgotamento	Obter colónias Isoladas (Washington, John A., 1981).	
	Rolamento	Inoculação através do rolamento do cateter sobre a superfície do meio (Washington, John A., 1981).	—
	Toalha	Obter um crescimento homogéneo sobre a superfície do meio.	
Meios sólidos em tubo	Rampa	Observação das propriedades morfológicas do microrganismo (Prescott, Harley, 2002).	
Meios Líquidos	Dispersão	Crescimento de microrganismos (Prescott, Harley, 2002).	

v. Observação das características culturais dos microrganismos

Quando inoculados em vários meios, os microrganismos exibem diferentes aparências macroscópicas ao longo do seu crescimento. Essas características culturais são usadas para separar os microrganismos em grupos taxonômicos (Cappuccino, James G. e Welsh, Chad, 2017). No entanto, para estudar e caracterizar uma espécie individual, é necessário obter culturas puras (Prescott, Harley, 2002). Para o laboratório de microbiologia, a observação das características culturais é muito importante porque permite *a priori* fazer uma identificação presuntiva do microrganismo e orientar o diagnóstico. Desta forma as colônias em cultura pura podem ser caracterizadas em placa quanto à sua forma, elevação, margem, (Figura 2) aparência, propriedades óticas, pigmentação, e textura (Tabela 7) (Prescott, Harley, 2002). É nesta fase que os meios diferenciais ganham especial importância, uma vez que mediante o metabolismo de determinados substratos presentes no meio, as colônias passam a apresentar determinadas características (Figura 3).

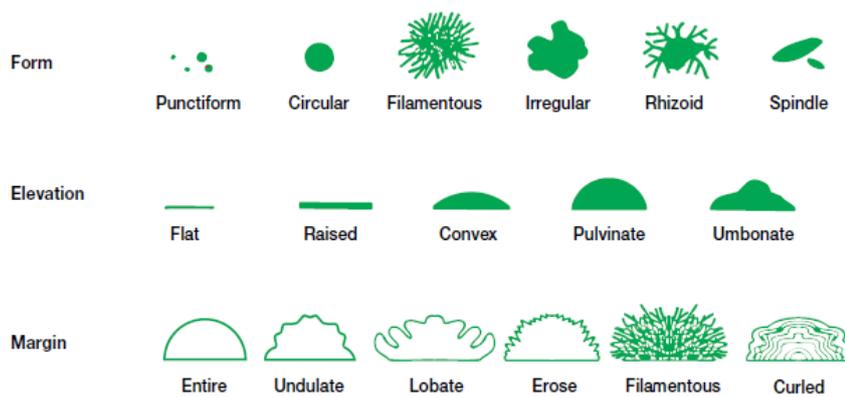


Figura 2: Morfologia das colônias em meio sólido em placa. (Figura adaptada de Prescott, Harley, 2002)

Tabela 7: Morfologia das colônias em meio sólido em placa.

Aparência	Brilhante ou matte
Propriedade óticas	Opacas, translúcidas e transparentes
Pigmentação	Pigmentadas (purpura, vermelho, amarelo, verde) Não pigmentas (creme, branco)
Textura	Lisas ou rugosas



Figura 3: A: Em Gelose de MacConkey, bacilos gram negativos fermentadores de lactose; B: Em Gelose de MacConkey, bacilos gram negativos não fermentadores de lactose. C) Em Gelose de sangue: à esquerda, colônias pequenas e brancas de cocos gram positivos; à direita: colônias grandes, cinzentas e mucosas de bacilos gram negativo. (Figuras adaptadas de Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., Manuselis, George, 2014)

III. Métodos de Identificação

i. Técnicas moleculares

GeneXpert® XVI

Atualmente, os laboratórios de microbiologia estão a evoluir no sentido da utilização de testes moleculares, nomeadamente PCR em tempo real, para o diagnóstico de infeções por bactérias, vírus, fungos ou parasitas e também para testes de suscetibilidade a antibióticos (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).

O Laboratório de bacteriologia do CHUC possui o GeneXpert® XVI que se baseia em técnicas de PCR em tempo real, com recurso a kits de reagentes para analíticos específicos. Estes testes são utilizados para propósitos clínicos e não para fins de investigação. No CHUC este aparelho é utilizado para a pesquisa da Toxina A/B do *Clostridium difficile*, *Streptococcus agalateae* em grávidas, *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, MRSA, e *Carbapenemases* diretamente das amostras clínicas.

ii. Espectrometria de massa: VITEK® MS

A espectrometria de massa tem sido utilizada ao longo dos anos na química para analisar massas moleculares de moléculas (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014). Atualmente é aplicada no laboratório de microbiologia para identificação de microrganismos. O laboratório de Bacteriologia dos CHUC utiliza o VITEK® MS da bioMérieux. Este aparelho utiliza a tecnologia MALDI-TOF-matrix-assisted laser desorption

ionization time-offlight, a qual se baseia na análise de proteínas altamente abundantes, principalmente ribossômicas, e proteínas com massa compreendida entre os 2,000 e os 20,000 Daltons (Wattal, C., Oberoi, J. K., Goel, N., Raveendran, R., e Khanna, S., 2017).

Na prática, a partir de uma colónia pura do microrganismo que se quer identificar, é feito um esfregaço fino numa lâmina metálica, seguido da aplicação de uma matriz ácida. A lâmina metálica é colocada no instrumento onde a mistura do microrganismo é atingida por raios laser. As pequenas moléculas dessorvidas e desionizadas são aceleradas através de um campo eletrostático e passam através de um tubo de vácuo até entrarem em contacto com o detetor do espectrómetro de massa. Moléculas de diferentes massas e cargas migram com diferentes velocidades, o que se vai refletir no tempo de voo (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013). Desta forma, a partir de um microrganismo desconhecido, um espectro de massa pode ser adquirido e a sua impressão digital proteica é então comparada às de um banco de dados espectral de referência para determinar o provável género e a espécie do microrganismo (Wattal, C., Oberoi, J. K., Goel, N., Raveendran, R., e Khanna, S., 2017). Após cultura, a identificação demora cerca de 1 hora.

Em termos de fiabilidade, estudos feitos comprovam que o Vitek MS dá uma boa identificação global ao nível do género e da espécie em isolados bacterianos e leveduras, no entanto, o método apresenta algumas limitações quanto aos resultados obtidos para micobactérias e fungos devido às falhas em protocolos de extração e às atualizações necessárias dos bancos de dados (Wattal, C., Oberoi, J. K., Goel, N., Raveendran, R., e Khanna, S., 2017).

IV. Testes de Suscetibilidade

A seleção de antibioterapia apropriada requer o conhecimento da ação do fármaco sobre o microrganismo, ou seja, a concentração de antibiótico que é efetiva na inibição do crescimento do microrganismo ou que pode induzir a morte do microrganismo. No entanto, o conhecimento da ação do fármaco sobre o microrganismo não é o suficiente para selecionar uma antibioterapia apropriada. É necessário ter em conta o historial clínico do doente, o seu estado imunológico e a patogenicidade da infeção. Estes fatores podem tornar difícil afirmar com precisão a eficácia do antibiótico (Washington, John A., 1981). O laboratório de Microbiologia, por rotina, avalia a concentração de antibiótico necessária para inibir ou destruir microrganismos *in vitro* através de testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA). Desta forma, os testes de suscetibilidade estão destinados a ser uma guia para o médico no tratamento, mas não uma garantia de que o antibiótico será 100% eficaz (Winn,

Washington C., Alen, Stephen D., Janda, William M., Koneman, Elmer W., Procop, Gary W., Schreckenberger, Paul C., e Woods, Gail L., 2006).

No laboratório de Bacteriologia dos CHUC só realiza TSA aos microrganismos referidos como potencialmente causadores de infeção e que possam estar relacionados com a história clínica do doente.

Os testes de suscetibilidade podem ser transmitidos qualitativamente e/ou quantitativamente. No primeiro caso os resultados são expressos como suscetíveis, intermediários ou resistentes e no segundo caso são expressos pela concentração mínima inibitória (CMI) (Washington, John A., 1981). A concentração mínima inibitória reflete a quantidade de antibiótico que é necessária para inibir o crescimento do inóculo *in vitro*, e desta forma, fornece uma boa estimativa da quantidade de fármaco necessária para inibir o crescimento *in vivo* do microrganismo, e assim aferir sobre a dosagem necessária para o paciente com o mínimo de efeitos adversos possíveis (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013). No laboratório de microbiologia dos CHUC executam-se dois tipos de testes de suscetibilidade: Os testes de suscetibilidade automática, que utilizam o equipamento VITEK® 2 e os testes de suscetibilidade manual em disco ou em Etest.

i. TSA manual

Alguns dos parâmetros e procedimentos de TSA manual, atualmente, encontram-se padronizados pela EUCAST, como por exemplo, o meio de cultura, o pH, a densidade de inóculo, a atmosfera e a temperatura de incubação. No laboratório de bacteriologia, o TSA manual realiza-se em meio de Muller-Hinton para obtenção de um crescimento rápido das bactérias aeróbias e anaeróbias. Para o crescimento de algumas bactérias fastidiosas como *H. influenzae* deve-se utilizar um meio de enriquecimento próprio. O pH do meio deve estar entre 7,2 e 7,4. Para a realização do inóculo, prepara-se uma suspensão bacteriana, a partir de uma cultura pura, com uma turbidez de 0,5 McFarland. Essa solução é inoculada a partir da técnica de sementeira em toalha, para que se possa obter um crescimento homogéneo de bactérias. As placas devem ser incubadas a 37°C, em atmosfera em aerobiose, por um período de 24 horas (Winn, Washington C., Alen, Stephen D., Janda, William M., Koneman, Elmer W., Procop, Gary W., Schreckenberger, Paul C., e Woods, Gail L., 2006).

Por difusão em disco: Método de Kirby Bauer

O princípio básico do TSA por difusão em disco é tão simples como a colocação de um disco impregnado de antibiótico sobre a superfície do meio sólido previamente inoculado com a solução bacteriana de forma homogênea. O disco entra em contacto com a superfície de agar húmida, o antibiótico começa a difundir-se pelo meio circundante. Após a incubação, é possível a visualização de um halo de inibição do crescimento. Como a concentração de antibiótico é maior no centro e menor nos limites do halo, o diâmetro do halo é sugestivo da CMI. A conversão do diâmetro em milímetros para a concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/ml}$ é baseada em curvas lineares de regressão estabelecidas pela EUCAST. Esta correlação está destinada a caracterizar o microrganismo como suscetível, intermédio ou resistente (Winn, Washington C., Alen, Stephen D., Janda, William M., Koneman, Elmer W., Procop, Gary W., Schreckenberger, Paul C., e Woods, Gail L., 2006).

Por Etest:

O princípio do teste TSA por ETest é semelhante ao princípio do TSA por difusão em disco. À superfície do meio são colocadas tiras graduadas impregnadas com antibiótico (Winn, Washington C., Alen, Stephen D., Janda, William M., Koneman, Elmer W., Procop, Gary W., Schreckenberger, Paul C., e Woods, Gail L., 2006). O gradiente antimicrobiano que se forma em torno das tiras de Etest dá origem a áreas inibitórias elípticas. A CIM é determinada onde a elipse de inibição intercepta a tira do Etest (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014). Este teste é mais dispendioso, pelo que preferencialmente se utilizam os métodos de difusão em discos, desde que em conformidade com as regras da EUCAST.

ii. Testes de suscetibilidade automática: Vitek® 2

O sistema Vitek 2 é um sistema automatizado que avalia suscetibilidades a antimicrobianos, através da avaliação do crescimento por turbidimetria (Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Procop, G. W., e Rinaldi, M. G., 2007).

Tabela 8: Cartas de Suscetibilidade Antimicrobianas utilizadas no VITEK® 2.

Cartas de Suscetibilidade Antimicrobianas utilizadas no VITEK® 2.

AST - 619: Carta utilizada para *Staphylococcus* spp

AST - 586: Carta utilizada para *Streptococcus* spp

AST - 192: Carta utilizada para Bacilo Gram Negativos

AST - 222: Carta utilizada para Bacilos Gram Negativos que apresentam maior número de resistências

AST: 576: Carta *S. pneumoniae*

Na prática, culturas puras obtidas após incubação em meio sólido em placa são suspensas em soluções salinas estéreis até atingir uma turbidimetria igual a 2,0 McFarland. Esta suspensão é colocada em cassetes próprias do sistema juntamente com a carta de teste de suscetibilidade adequada a cada microrganismo (Tabela 8) (Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Procop, G. W., e Rinaldi, M. G., 2007). Cada carta de teste contém poços onde se encontram antibióticos liofilizados. Esses poços estão ligados por um tubo de transferência ao tubo de ensaio que contém a suspensão. As cassetes são colocadas em câmaras de evacuação o que permite que a suspensão microbiana seja transferida para a carta. Todos os poços contêm várias concentrações de agentes antimicrobianos que são reconstituídos após a inoculação. Após este processo a carta é colocada no equipamento e a avaliação do crescimento é efetuada automaticamente a cada 15 minutos (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014). Este método permite expressar resultados quantitativos com base na CMI, acompanhados pelas interpretações dos resultados como suscetível, intermediário ou resistente (Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Procop, G. W., e Rinaldi, M. G., 2007) ao fim de 4 a 18 horas (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).

3.1.1.2 Amostras

I. Urina:

As infecções do trato urinário (UTIs) são as mais comuns, resultam da multiplicação de microrganismos no trato urinário. O diagnóstico depende dos resultados da sumária de urina e da urocultura em combinação com os sintomas clínicos. UTIs ocorrem com mais frequência em mulheres do que em homens, sendo que esta tendência se iguala com o avançar da idade (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013). Existem outros grupos de risco, como por exemplo, grávidas, pacientes imunocomprometidos (pacientes transplantados renais), pacientes com catéteres, e pacientes com anomalias no trato genitourinário.

Uma infecção do trato urinário pode resultar em vários síndromes clínicos, dependendo dos órgãos envolvidos: pielonefrite aguda e crônica (infecção do rim e pelve renal), cistite (infecção da bexiga), uretrite (infecção da uretra), epididimite (infecção do epidídimo) e prostatite (infecção da próstata). Para além disto, as UTIs podem ser classificadas quanto à sua recorrência: UTIs de episódio isolado vs UTIs de repetição, e quanto à complexidade: UTIs complicadas vs UTIs não complicadas.

Na análise sumária da urina a presença de leucócitos, de eritrócitos, proteínas e bactérias na urina pode ser sugestiva de UTI. A amostra de urina para análise microbiológica colhida por

micção (jato médio) é feita após a higienização da zona genital e posteriormente é colocada e transportada num tubo de ácido bórico (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). A presença de bactérias é confirmada pela cultura *in vitro* da urina (Tabela 9).

Tabela 9: Processamento laboratorial da amostra de urina colhida por micção.

Exame Microscópico		Não aplicável
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose sangue CLED
	Processamento	Ansa calibrada de 0,01/0,001 mL
	Incubação	Em atmosfera de aerobiose a 37 °C de 18h -24h.

As colónias de bactérias e leveduras são enumeradas e multiplicadas pelo fator de diluição x100 para fornecer a contagem final de colónias. Assim 1-10 colónias representa 10^3 UFC/ml, 10-100 colónias representa 10^4 UFC/ ml, 100 a 1000 colónias representa 10^5 UFC/ml e > 1000 colónias representa > 10^5 UFC/mL (Washington, John A., 1981). A valorização é feita de acordo com a tabela 10.

Tabela 10: Modo de ação perante uroculturas negativas e positivas.

Ausência de crescimento ao fim de 14h de incubação		Negativo
Crescimento de $\geq 10^5$ UFC	1 tipo de colónia	Identificação e TSA.
	2 tipos de colónia	Repicagem para CLED se bacilo Gram negativo, repicagem para GS se coco Gram positivo.
	>2 tipo de colónias	Presença de flora mista/contaminação; Rejeita-se a amostra e sugere-se nova colheita.
Crescimento entre 10^4 e 10^5 UFC	1 tipo de colónia	Identificação e TSA.
	>2 tipos e de colónias	Presença de flora mista/contaminação, rejeita-se a amostra, sugere-se nova colheita.
Crescimento <math>10^3</math> UFC	1 tipo de colónia	A identificação e o TSA efetuam-se de acordo com a clínica do doente (Transplantados renais, grávidas, etc.).

Dos agentes bacterianos responsáveis por UTIs não complicadas do trato urinário inferior destaca-se *E. coli* com uma prevalência de 80-90 % dos casos, seguindo-se de *Staphylococcus saprophyticus*. Nas UTIs complicadas e do trato urinário superior, o espectro de agentes etiológicos é maior e são caracterizados por possuírem maior resistência aos agentes antimicrobianos. *E. coli* está frequentemente presente assim como outros bacilos

Gram negativos com *Proteus* sp., *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013). Em ambiente hospitalar, para além dos microrganismos anteriores, destacam-se outros bacilos Gram negativos como *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.. *Staphylococcus epidermis* faz parte da flora uretral, e portanto aparece comumente nas uroculturas, no entanto, só se encontra associado a UTIs em 20% dos casos (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014). Outros cocos Gram positivos comuns são *S. agalatae* (grupoB), *S. pyogenes* (grupo A) e *Staphylococcus aureus*. Espécies de *Candida* spp. também aparecem em urocultura, mas não estão associadas a UTIs em adultos saudáveis, é mais comumente visto em doentes hospitalizados e com cateteres.

II. Fezes

Um grande número de agentes é conhecido como causa de infeções gastrointestinais. As bactérias, por exemplo, provocam diarreia por vários mecanismos desde a produção de toxinas (ingeridas na comida ou produzidas no intestino) à invasão da mucosa intestinal. A causa de diarreia pode ser determinada pela história clínica, história recente da ingestão de alimentos, viagens recentes, exame físico e exame às fezes. Em bacteriologia, o exame às fezes envolve o exame macroscópico e a coprocultura (Tabela II). O exame às fezes torna-se extremamente útil na diferenciação dos pacientes que possuem doenças bacterianas do tipo invasiva ou mediadas por toxinas, e ainda na distinção das doenças provocadas por vírus ou parasitas (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).

Dado que as fezes são um produto rico em microrganismos, o isolamento do agente etiológico causador de doença pode equiparar-se “à procura de uma agulha no palheiro”, por isso é necessário o conhecimento dos agentes etiológicos mais comuns e dos requisitos nutricionais específicos de cada um para uma melhor orientação do diagnóstico. *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, a *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Clostridium difficile* e *Yersinia enterocolitica* são os patógenos mais comuns envolvidos na diarreia (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).

Como são microrganismos com requisitos nutricionais específicos, a coprocultura é efetuada em vários tipos de meios para que se obtenha um crescimento seletivo, o isolamento e a identificação do microrganismo causador da doença (Tabela II).

Tabela 11: Modo processamento de amostras de fezes.

Exame macroscópico	Constituição da amostra: fezes diarreicas ou moldadas; sanguinolentas, com muco ou aquosas.	
Exame Microscópico	Não aplicável	
Exame cultural	Meio de Cultura	CBGN Gelose SS; Gelose HEK; Gelose Campy; Gelose CIN
	Processamento	Sementeira por esgotamento Sementeira por dispersão
	Incubação	Os meios de gelose de sangue, os seletivos para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> e CIN em aerobiose a 37°C de 18-24 horas. O meio <i>Campylobacter</i> em atmosfera microaerofílica a 42°C durante 48 a 72 horas.

III. Sangue

A presença de bactérias no sangue cujo crescimento seja observado em cultura, é chamado estado de bacteriemia. Cabe distinguir o estado de bacteriemia e de septicemia. O termo septicemia é utilizado para descrever um estado de bacteriemia na presença de sinais físicos e sintomas característicos de invasão bacteriana ou produção de toxinas. Culturas de sangue positivas nem sempre são sinónimos de bacteriemia podendo resultar de contaminações durante a colheita da amostra. Essas contaminações são normalmente por comensais da pele com estafilococos coagulase negativa (StaNeg) (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014; Washington, John A., 1981).

As bacteriémias podem ser classificadas quanto ao sítio de origem e duração. Quanto ao local de origem podem ser bacteriémias primárias (quando bactéria provem de uma fonte endovascular, como um catéter intravenoso infetado), bacteriémias secundárias (quando a bactéria provem de uma fonte extravascular, como um abscesso) e bacteriemia de origem desconhecida. Os episódios de bacteriemia podem ser transitórias (ocorrem normalmente ao fim de manipulação de uma zona do corpo colonizada com microbiota, fazendo com que os organismos entrem no sangue e são rapidamente eliminadas pelo sistema imunológico), intermitentes (os microrganismos são libertados periodicamente pelo sitio infeção, como um abscesso) e contínuas (aparecem quando a fonte de bactérias é endovascular, como por exemplo, endocardite, conseqüentemente as bactérias estão constantemente na corrente sanguínea) (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).

A colheita de amostras para hemocultura requer o uso de técnicas assépticas para evitar contaminações. É necessário a desinfecção da pele e da garrafa de hemocultura antes da colheita do sangue por punção venosa. São colhidas pelo menos 2 a 3 amostras de sangue

em locais anatómicos diferentes para garrafas de hemoculturas diferentes. O volume das amostras é crítico porque a concentração dos microrganismos no sangue é baixa, portanto, para adultos o volume recomendado são 10 a 30 mL por punção venosa e para crianças 1 a 5 mL. (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). As garrafas de hemocultura quando chegam ao laboratório são colocadas no aparelho BacT/ALERT® 3D. O aparelho é verificado diariamente para retirar as garrafas que já perfizeram o tempo de incubação (Tabela 12, 13).

Tabela 12: Modo de atuação perante uma garrafa de hemocultura que já fez o tempo de incubação.

Garrafa de hemocultura Negativa ao fim de 5 dias	Rejeitar amostra	
Garrafa de hemocultura positiva ao fim de 5 dias	Exame microscópico	Coloração de Gram
	Exame cultural	
	Meio de Cultura	Gelose de sangue
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	24h-48h a T°37C

Tabela 13: Modo de ação perante amostras, que com garrafas de hemocultura positivas, resultam em culturas positivas ou negativas.

Cultura negativa	Repicagem para PVX da garrafa de hemocultura e incubar na estufa	
Cultura positiva	1 tipo de colónia	Identificação e TSA.
	1 tipo de colónia do tipo StaNeg	Identificação se a positividade se confirmar nas 2 hemoculturas do mesmo doente, se o doente é transplantado, imunodeprimido, criança ou pertence aos serviços de cardiologia, hematologia e medicina intensiva.
	2 tipos de colónia	Identificação e repicagem para CNA ou para CLED consoante seja CGP ou BGN.

Quando se suspeita de bacteriemias do tipo primário com origem em catéteres, o catéter pode ser enviado para o laboratório para análise microbiológica (Tabela 14). Se o desenvolvimento bacteriano for >15 colónias deve-se valorizar e proceder à identificação.

Tabela 14: Modo processamento de cateteres.

Exame Microscópico		Não aplicável
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose de sangue Brain Heart Infusion
	Processamento	Sementeira por rolamento Sementeira por dispersão
	Incubação	T°37C

Relativamente aos agentes etiológicos responsáveis por bacteriemias, os mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Streptococcus pneumoniae* (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014) e espécies de StaNeg e outros comensais, em pessoas com cateteres vasculares, hospitalizadas ou imunodeprimidos.

IV. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

As infeções do sistema nervoso central mais comuns são Encefalite (inflamação do cérebro), Encefalomielite (Inflamação do cérebro e da espinal medula), Meningite (inflamação das meninges), Meningoencefalite (inflamação do cérebro e das meninges) e Mielite (inflamação da espinal medula). O diagnóstico das infeções do sistema nervoso central é baseado na análise de LCR obtido por punção lombar. As amostras de LCR devem ser transportadas e processadas o mais rapidamente possível para prevenir a perda do agente em causa (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004).

Inicialmente, o LCR total é analisado quanto à concentração de glicose e proteína, quanto ao número de células e à presença de leucócitos. No laboratório de bacteriologia o LCR é previamente concentrado por centrifugação. Este processo tem como objetivo melhorar o rendimento da observação microscópica do microrganismo e das células presentes, assim como melhorar o rendimento da cultura *in vitro*. Na tabela seguinte está descrita a forma como o LCR é processado.

Tabela 15: Modo processamento LCR.

Exame Macroscópico		Observar cor e turbidez
Exame Microscópico		Coloração de Gram
Exame cultural do sedimento	Meio de Cultura	Gelose de sangue PVX Brain Heart Infusion
	Processamento	Sementeira em gota
	Incubação	Atmosfera aerofílica a T°37C durante 24 a 72 horas

As bactérias que mais comumente causam infecções no sistema nervoso central relativamente à idade são: em recém nascidos: bacilos Gram negativos (*E.coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*), *Streptococcus agalactae* e *Listeria monocytogenes*; em bebês: *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*; em crianças: *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*; e em adultos e idosos: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e bacilos Gram negativos (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).

V. Outros líquidos:

Os líquidos orgânicos são normalmente estéreis e qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado.

A colheita de um líquido estéril é feita por punção e deve ser sempre realizada com uma técnica asséptica. Todos os fluidos normalmente estéreis devem ser inoculados diretamente no meio apropriado, como demonstrado nas tabelas seguintes, ou podem ser inoculados em garrafas de hemocultura, o que não dispensa o envio da amostra para os restantes estudos (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). O exame microscópico, para além de avaliar a flora existente, avalia também a presença de células e leucócitos. Nas tabelas seguintes apresenta-se o modo de processamentos das amostras de líquido pleural, peritoneal e sinovial.

i. Pleural

Tabela 16: Modo processamento de líquido pleural.

Exame Microscópico	Coloração de Gram	
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose de sangue
		CN PVX Brain Heart Infusion
	Processamento	Sementeira por esgotamento Sementeira por dispersão
Incubação	Durante 14-24h a T°37C	

ii. Peritoneal & sinovial:

Tabela 17: Modo processamento de líquido peritoneal e sinovial.

Exame Microscópico	Coloração de Gram	
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose de sangue
		CNA
		Cooked meat
Processamento	Sementeira por esgotamento	
	Sementeira por dispersão	
Incubação	Durante 14-24h a T°35C	

VI. Secreções respiratórias: Expetoração, Secreções brônquicas: Aspirado Transtraqueal, Lavado brônquico e Lavado bronco-alveolar.

Tendo em conta o local anatómico da infeção, existem várias infeções do trato respiratório. Desta forma existem infeções do trato respiratório superior (Tabela 18) e inferior (Tabela 19) que possuem diferentes agentes etiológicos.

Tabela 18: Infeções do trato respiratório superior mais frequentes e os respetivos agentes etiológicos bacterianos (Tabela adaptada Mahon et al., 2014).

Infeções do trato respiratório superior mais frequentes	Agentes etiológicos bacterianos
Faringite	<i>Streptococcus pyogenes</i> (S. β -hemolítico do grupo A) <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Tosse convulsa	<i>Bordetella pertussis</i>
Laringite	S. β -hemolítico do grupo A
Epiglotite	<i>Haemophilus influenzae</i> do tipo B
Sinusite	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
Otite Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>

Tabela 19: Infecções do trato respiratório inferior mais frequentes e os respetivos agentes etiológicos bacterianos (Tabela adaptada Mahon et al., 2014).

Infeções do trato respiratório inferior mais frequentes	Agente etiológico bacteriano mais frequente
Bronquite	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> .
Pneumonia da comunidade	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Pneumonia Nosocomial	Bacilos Gram negativo (<i>Klebsiella spp</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Escherichia spp</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Acinetobacter</i>). Cocos Gram Positivo (<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistentes).
Pneumonia por aspiração	Bactérias anaeróbias (<i>Bacteroides spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Fusobacterium spp</i>) Bactérias aeróbias (<i>Streptococcus spp</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>S.</i> <i>aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>).
Pneumonia crónica	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> e micobactérias não tuberculosas.

A nível do trato respiratório superior existe uma flora mista abundante, constituída por aeróbios e anaeróbios (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). No diagnóstico bacteriológico das infeções respiratórias do trato superior é importante saber distinguir entre uma cultura positiva por flora comensal e uma cultura positiva por um microrganismo que pode ser potencialmente patogénico e causador de doença (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014). As amostras do trato respiratório inferior são frequentemente contaminadas pela flora comensal do trato respiratório superior, portanto, é importante que o laboratório valorize apenas espécies em amostras com boa qualidade. As amostras devem ser enviadas ao laboratório num recipiente estéril e seco. Todas as amostras contaminadas por saliva ou rinorreia devem se desprezadas (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004).

O processamento das amostras é feito de acordo com as tabelas seguintes.

Tabela 20: Processamento de expetorações e aspirados transtraqueais.

Exame Microscópico	Coloração de Gram	
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose de sangue Gelose HAE
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	24-48h a T°37C em atmosfera 5% de CO ₂ .

Tabela 21: Processamento de Lavados Brônquicos e Bronco-alveolares.

Exame Microscópico	Coloração de Gram	
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose de sangue Gelose PVX
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	24h a T°37C em atmosfera 5% de CO ₂ .

Na observação microscópica da coloração de Gram, para além de se avaliar a presença de flora bacteriana, deve-se classificar as amostras de acordo com critérios baseados em Murray e Washington (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014) os quais têm em conta a presença de células epiteliais pavimentosas e leucócitos. Esta classificação permite avaliar a qualidade da amostra (Tabela 22).

Tabela 22: Classificação de amostras do trato respiratório, baseado na observação microscópica da coloração de Gram, pelo laboratório de bacteriologia dos CHUC.

Classificação da Coloração do Gram	Células epiteliais Pavimentosas (observação microscópica de 10x)	Neutrófilos (observação microscópica de 10x)
(1,1)	<10 por campo	<10 por campo
(2,2)	10-25 por campo	10-25 por campo
(3,3)	≥25 por campo	≥25 por campo

Segundo este critério, as amostras a valorizar e de boa qualidade são aquelas cujas células epiteliais não ultrapassam as 10 células por campo.

A valorização das culturas é feita de acordo com a observação do Gram e da informação clínica do paciente (Tabela 23).

Tabela 23: Valorização das colônias obtidas e orientação do diagnóstico de acordo com a observação do Gram e da informação clínica do paciente.

Cultura negativa	Observação microscópica (1,2) ou (1,3)	Colocar na estufa até completar 48h de incubação.
	Observação microscópica (1,1)	Reportar como flora pobre.
Cultura positiva	Observação microscópica (1,2) ou (1,3)	Se o agente etiológico suspeito estiver isolado procedesse a identificação e a TSA. Se o agente etiológico suspeito não está isolado procedesse a repicagem para o meio mais apropriado.
	Observação microscópica (2,1) ou (3,1) ou (2,2) ou (2,3) ou (3,2) ou (3,3)	Crescimento polimicrobiano. Rejeita-se a amostra. Sugere-se o envio de nova amostra.

VII. *Exsudados Purulentos: Zaragatoas e Aspirados de feridas, Aspirados de pus de abscesso, Material de tecidos e biópsias.*

Devido às múltiplas variáveis envolvidas, a metodologia para o estudo microbiológico de qualquer exsudado purulento tem de ter em consideração o local de infecção, a história clínica, o tipo de infecção (abecedada ou não) e o modo de colheita (Zaragatoas ou Aspirados).

Perante uma variedade de situações clínicas e de agentes microbianos implicados (Tabela 25), os procedimentos aplicados são geralmente iguais para qualquer uma das amostras de exsudado e estão descritos na tabela seguinte.

Tabela 24:Processamento de Exsudados purulentos.

Exame Microscópico	Coloração de Gram	
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose de sangue
		CNA
		Cooked Meat
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	18-24h a T°37C

Tabela 25: Microrganismos frequentemente envolvidos em infecções da pele e tecidos moles. (Quadro adaptado Washington, 1981).

Microrganismos	Infeção ou síndrome
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Lesões actinomicóticas
<i>Aeromonas spp.</i>	Feridas
<i>Capnocytophaga spp.</i>	Abcessos
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Abcessos
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Feridas; Infecções de cateteres
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	Feridas de mordida de cão
<i>Eikenella corrodens</i>	Infecções de tecidos moles; mordida humana
<i>Enterobactériasceae</i>	Feridas; Feridas crônicas e/ou profundas; lesões de queimaduras
<i>Enterococcus spp.</i>	Feridas; lesões de queimaduras.
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	“Erisipelóide”
<i>Haemophilus influenzae</i>	Lesões cutâneas associadas com infecções Sistêmicas
<i>Kingella kingae</i>	Infecções ósseas ou de articulações
Flora oral	Feridas de mordeduras
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Lesões cutâneas associadas com infecções sistêmicas
<i>Nocardia spp</i>	Abcessos cutâneos ou subcutâneos
<i>Pasteurella multocida</i>	Mordida de animais; osteomielite
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Feridas; lesões de queimadura; furunculose
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecções eritematosas superficiais; infecções profundas; abcessos; lesões de queimadura; feridas; furúnculos.
<i>Staphylococcus spp. coagulase negativo</i>	Cateteres
<i>Streptococcus pyogenes (Grupo A)</i>	Infecções eritematosas superficiais; infecções profundas; abcessos; lesões de queimadura; feridas; furúnculos; necrose muscular
<i>Streptococcus spp. beta-hemolítico</i>	Feridas
<i>Streptococcus spp. “grupo viridans”</i>	Feridas; cateteres; mordeduras.
<i>Streptococcus moniliformis</i>	Mordida de animais
<i>Vibrio vulnificus</i>	Feridas; necrose muscular

VIII. Exsudados vaginais, endocervicais, uretrais, retais e de úlceras genitais

A determinação de amostras apropriadas para o diagnóstico de infecções do aparelho genital depende do local de infecção e dos microrganismos. Algumas infecções do aparelho genital feminino são causadas por microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora comensal (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004). O exame cultural deste tipo de amostras é geralmente limitado ao isolamento e identificação de microrganismos associados a doenças sexualmente transmissíveis, embora haja exceções (Washington, John A., 1981).

No laboratório de bacteriologia dos CHUC, a valorização clínica das culturas é efetuada de acordo com a informação clínica e o exame microscópico. Por rotina, os agentes

etiológicos bacterianos mais pesquisados por cultura *in vitro* estão descritos na tabela a baixo.

Tabela 26: Espécies bacterianas mais frequentemente pesquisadas no laboratório de bacteriologia e respetiva patologia associada (Tabela adaptada de Fonseca, Bruschy Ana, Sebastião, Clotilde, Ribeiro Carvalho, Maria Graça V., Calheiros, Ismália, Lito, Luis, Abecassis, Margarida, Pinto, Margarida, Spencer, Maria Odete, Pinheiro, Maria Paula, Costa, Maria Teresa, Barros, Rosa Maria, e Bento, Rosa Fula, 2004).

Vulvo-vaginites	
Vaginose Bacteriana	Pesquisa de Clue cells e eventualmente pesquisa de <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mobiluncus spp.</i>
<i>Actinomyces spp</i>	Associado ao uso de DIU
<i>Listeria monocytogenes</i>	Associado a abortos de repetição
<i>Staphylococcus aureus</i>	Associado ao uso de tampões
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Valorizar em grávidas
Endocervicites	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Clamidiose genital
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorreia
<i>S. agalactiae</i>	Valorizar em grávidas
<i>Actinomyces spp</i>	Associado ao uso de DIU
Reto	
<i>Neisseriae gonorrhoeae</i>	Gonorreia
<i>Clamidia trachomatis</i>	Clamidiose genital
Uretrites	
<i>Neisseriae gonorrhoeae</i>	Gonorreia

O exame direto a fresco torna-se útil para a pesquisa do parasita *Trichomonas vaginalis*. *Chlamydia trachomatis* e *S. agalactiae* podem ser identificadas diretamente da amostra utilizando o GeneXpert® XVI. Os exsudados genitais são processados de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 27: Processamento de exsudados genitais.

Exame Microscópico	Exame direto a fresco Coloração de Gram	
Exame cultural	Meio de Cultura	Gelose de sangue
		CNA PVX/VCAT Cooked Meat
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	18-24h a T°37C

3.1.2 Laboratório de Micobactérias

As micobactérias são um grupo especial de bactérias, são bacilos aeróbios, imóveis, não formadores de esporos. A sua parede celular é rica em lípidos, o que torna a sua superfície hidrofóbica e resistente a vários desinfetantes e colorações de laboratório. Uma vez corados estes bacilos não podem ser descorados com soluções ácidas, por isso se chamam bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). Pelo facto de a parede celular ser complexa (parede celular das micobactérias é típica de bactérias Gram positivas: possui uma membrana plasmática recoberta com uma camada espessa de peptidoglicano e ausência de membrana externa, no entanto é mais complexa que as restantes bactérias Gram positivas porque ancorado á parede celular contém arabinogalactano, lipoarabinomanano, ácido micólico, lípidos, glicolípidos e proteínas) este grupo de bactérias é exigente, e cresce muito lentamente (divide-se a cada 12-24 horas), requerendo um período de pelo menos 6 semanas para que seja observado crescimento em cultura (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

As micobactérias são uma causa significativa de morbidade e mortalidade. Atualmente mais de 200 espécies de micobactérias já foram descritas. Apesar disso só algumas espécies causam infeções em humanos: *Micobacterium tuberculosis complex* causa tuberculose, é um patógeno muito importante para humanos; *M. leprae* causa lepra; O complexo *M. avium*, e outras micobactérias estão descritas como potencialmente causadores de doença, especialmente em pessoas imunocomprometidas (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013). Os Laboratórios que pesquisam micobactérias necessitam de requisitos especiais de segurança. Por este motivo, o Laboratório de Micobactérias dos CHUC é separado fisicamente dos outros.

3.1.2.1 Diagnóstico laboratorial

As amostras que chegam ao laboratório de micobactérias dos CHUC são amostras do trato respiratório (expetorações, lavados e aspirados), urina, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquidiano, fezes, suco gástrico e biópsias. O diagnóstico laboratorial destas amostras é baseado na observação microscópica, no isolamento em cultura e na identificação molecular dos bacilos ácidosresistentes.

1. Descontaminação, Concentração das amostras

Para a pesquisa e cultura de BAAR, é necessário que as amostras sofram um processamento prévio. Esse processamento inclui a descontaminação e a concentração das amostras. As amostras devem ser liquefeitas com N-acetyl-L-cisteína, descontaminadas com

NaOH (que mata qualquer outra bactéria ou fungo), neutralizadas com tampão e concentradas por centrifugação. O LCR dispensa a etapa de descontaminação, porque *à priori* é um líquido estéril, podendo ser diretamente centrifugado, examinado e cultivado (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013).

II. Microscopia da amostra

A detecção microscópica de bactérias acidorresistentes em amostras clínicas é a forma mais rápida de rastreio de doença por micobactérias (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014). Os métodos convencionais de coloração ácidorresistente são as colorações de Ziehl-Neelsen e Kinyoun. Ambos os métodos utilizam a carbofucsina como corante primário, um álcool-acido como agente descorante e o azul-de-metileno como corante de contraste. Este procedimento de coloração no método Ziehl-Neelsen envolve aplicação de calor na coloração com carbofucsina, enquanto que a coloração Kinyoun é uma coloração fria e é a utilizada pelo laboratório (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014). Desta forma as micobactérias aparecem vermelhas num fundo azul. Esta reação de coloração, junto com a observação do tamanho e da forma característica possibilita, por um lado, a semi-quantificação dos bacilos ácidorresistentes presentes na amostra, e por outro lado a orientação do diagnóstico. A coloração Ziehl-Neelsen aplica-se não só as amostras, como também as culturas positivas.

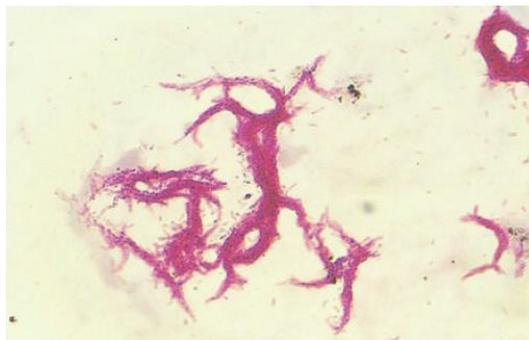


Figura 4: *Micobacterium tuberculosis* corado com carbofucsina, utilizando o método Kinyoun (Figura adaptada de Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

III. Cultura in vitro

As amostras previamente processadas podem ser cultivadas nos meios que se encontram descritos na seguinte tabela:

Tabela 28: Meios de cultura e respetivas incubações utilizados no Laboratório de Micobactérias.

Meios de cultura	Incubação
BD BACTEC™ MGIT™ PANTA™	
<p>O tubo indicador de crescimento de micobactérias (MGIT) contém meio de crescimento Middlebrook 7H9 acrescido de um indicador de fluorescência destinado para deteção manual e recuperação de micobactérias. A adição de uma mistura de antibióticos (PANTA) suprime o crescimento de flora normal e favorece o crescimento e a deteção de micobactérias no MGIT. Esta mistura de antibióticos consiste em Polimixina B, Anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina. Uma cultura positiva pode ser identificada de forma manual ou pelo sistema BD BACTEC MGIT 960. De forma manual a identificação faz-se através da observação da turbidimetria não homogênia, do tipo floco de neve, ou por fluorescência utilizando uma lâmpada com comprimento de onda UV elevado (p.e Lâmpada de Wood). O sistema BD BACTEC MGIT 960 utiliza uma tecnologia fluorométrica para facilitar a deteção precisa do consumo de oxigénio que é diretamente proporcional ao crescimento de micobactérias (Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., e Manuselis, George., 2014).</p>	<p>A incubação é feita no interior do BACTEC MGIT 960. Este equipamento é capaz de detetar o crescimento das micobactérias num tempo médio de 13.3 dias (Winn, Washington C., Alen, Stephen D., Janda, William M., Koneman, Elmer W., Procop, Gary W., Schreckenberger, Paul C., e Woods, Gail L., 2006).</p>
Meio de Lowenstein-Jensen	
<p>É um meio sólido utilizado para a cultura e isolamento de micobactérias. A sua formulação é relativamente simples contém glicerol, farinha de batata, sais, e ovos inteiros (a coagulação da albumina dos ovos é utilizada para solidificar o meio) (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014). Ao meio é adicionado também RNA para melhorar a recuperação de bacilos ácidosresistentes. O meio torna-se seletivo pela adição de verde-malaquita que inibe Gram positivas e penicilina que inibe Gram positivas e Gram negativas (Zimbro, Mary Jo, Power, David A., Miller, Sharon M., Wilson, George E., e Johnson, Julie A., 2009).</p>	<p>Incubação a 35–37°C em atmosfera de 5–10% de CO₂ por pelo o menos 6 semanas. (Se o resultados da cultura forem negativos, mas no entanto existir uma coloração positiva, ou se suspeita de uma bactéria de crescimento lento, deve-se fazer uma nova inoculação e esta deverá ser incubada a uma temperatura mais baixa 24-33°C. Ambas as culturas devem ser incubadas por mais 1 semana) (Brooks, Geo. F., Carroll, Karen C., Butel, Janet S., Morse, Stephen A., e Mietzner, Timothy A., 2013).</p>

IV. Métodos de Identificação

Na observação dos bacilos ácidosresistentes ao microscópio ótico é importante ter em conta o seu aspeto característico (ex. cordas, aglomerados, disperso) para orientar a sua identificação.

Testes moleculares são realizados de acordo com os resultados obtidos da observação microscópica e das características culturais da micobactéria (Figura 5). Atualmente no serviço dos CHUC estão disponíveis três tipos de testes moleculares, dois para identificação de grupos de espécies de *Micobacterium spp.* e um para a Identificação do complexo *M. tuberculosis* em conjunto com a resistência à rifampicina e/ou isoniazida (Tabela 29). Estas provas podem ser realizadas quer a partir do meio de cultura sólido quer do líquido.

Tabela 29: Testes moleculares de identificação mais utilizados no laboratório de Micobactérias.

Teste molecular	Funcionalidade
GenoType <i>Mycobacterium</i> AS	Deteção de "Espécies Adicionais" permite a diferenciação de 19 espécies clinicamente relevantes (Hain Lifescience, 2017).
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM	Deteção das micobactérias mais comuns pertencentes ao complexo <i>Micobacterium tuberculosis</i> (<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. canetti</i> e <i>M. pinnipedii</i>) e de mais 27 espécie não tuberculosas clinicamente relevantes (Hain Lifescience, 2017).
Geno Type MTBDR <i>plus</i>	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> e sua resistência à rifampicina e / ou isoniazida em amostras clínicas pulmonares ou amostras cultivadas (Hain Lifescience, 2017).

Estes métodos utilizam DNA • STRIP technology que basicamente consiste no isolamento do DNA da amostra, o qual posteriormente é amplificado e sequências específicas detetadas por meio de uma reação de hibridização e uma reação com fosfatase alcalina numa tira membrana. Após o isolamento do DNA, as sequências são seletivamente replicadas numa reação de amplificação. Na etapa seguinte, as cadeias de DNA são quimicamente desnaturadas, uma vez que DNA • STRIP technology só deteta DNA de cadeia simples.

O DNA • STRIP é revestido com sondas altamente específicas que são complementares às sequências de ácido nucleico amplificadas seletivamente. Os nucleótidos da cadeia simples ligam-se especificamente às sondas análogas durante a hibridização, enquanto os nucleótidos não especificamente ligados são removidos nas etapas subsequentes de lavagem.

Durante a reação de hibridização, os nucleótidos especificamente ligados são marcados com a enzima fosfatase alcalina, ocorrendo uma reação colorimétrica que torna visível a hibridização. Desta forma, um padrão de bandas específico desenvolve-se na DNA • STRIP (Figura 6). Usando um modelo de avaliação específico do teste, o resultado do teste pode ser lido com rapidez e clareza. Usando este ensaio pode-se determinar com segurança o

genótipo ou patógeno microbiológico presente, bem como suas resistências (Hain LifeScience, 2016).

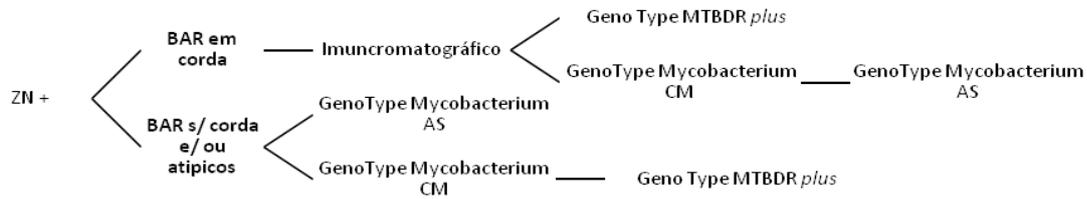


Figura 5: Organização do diagnóstico clínico desde a coloração das micobactérias até à identificação ao nível da espécie.

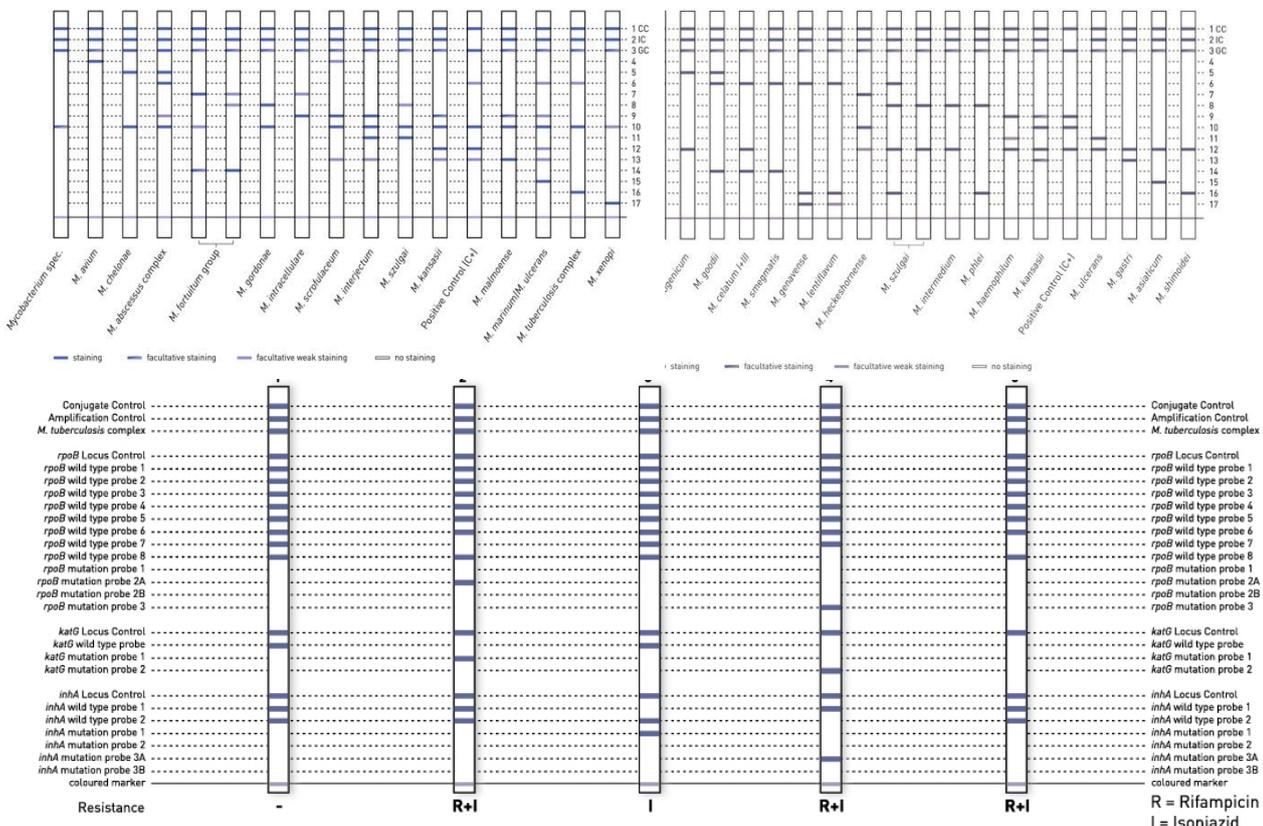


Figura 6: (A) Modelo representativo das tiras de GenoType Mycobacterium CM utilizado na identificação das espécies do complexo *M. tuberculosis* e na diferenciação de espécies não tuberculosas clinicamente relevantes (Hain Lifescience, 2017). (B) Modelo representativo das tiras de The GenoType Mycobacterium AS utilizado na diferenciação de 19 espécies não tuberculosas clinicamente relevantes (Hain Lifescience, 2017). (C) Modelo representativo das tiras de Geno Type MTBDR plus utilizado na identificação da resistência à rifampicina e à isoniazida. A resistência à rifampicina é possibilitada pela deteção das mutações mais significativas do gene *rpoB* (que codifica a subunidade β da RNA polimerase). Para testar a resistência de isoniazida de alto nível, o gene *katG* (codificando para a peroxidase de catalase) é examinado e para testar a resistência de isoniazida de baixo nível, a região promotora do gene *inhA* (codificando para NADH enoil ACP redutase) é analisada (Hain Lifescience, 2017).

3.1.3 Laboratório de Parasitologia

As doenças parasitológicas estão presentes em todo mundo, apesar de existirem zonas onde há maior prevalência. A prevalência das doenças parasitológicas é maior em climas tropicais e subtropicais. Estas doenças são influenciadas por condições ambientais e por pobres condições sanitárias e de higiene. Para além disso, certas populações tem maior risco de contrair essas doenças que outras, nomeadamente os viajantes das áreas endémicas e os emigrantes. Atualmente, com o aumento do tráfego mundial, há o conseqüente aumento das populações consideradas de risco, pelo que é necessário que haja conhecimento dos sintomas clínicos e dos testes laboratoriais existentes (Zeibig, Elizabeth A. G., 2013).

3.1.3.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico parasitológico é feito quase na totalidade pela demonstração morfológica, a nível microscópico, dos parasitas na amostra. Ocasionalmente o recurso a métodos serológicos e/ou moleculares pode ajudar a estabelecer o diagnóstico (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014). No laboratório de parasitologia do CHUC as amostras para análise parasitológica predominantes são fezes e sangue.

I. Fezes e parasitoses intestinais

Os protozoários e os helmintas podem colonizar tratos intestinais do homem (Tabela 30). Para o diagnóstico das parasitoses intestinais, é necessário realizar várias colheitas e vários testes para otimizar a deteção de microrganismos que são eliminados de modo intermitente. Para um exame parasitológico de rotina, recomenda-se um total de três amostras fecais, colhidas em dias alternados (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

Tabela 30: Parasitas intestinais encontrados em fezes

Protozoários	Filo Sarcomastigophora	Sub-filo Mastigophora	<i>Giardia lamblia</i> <i>Chilomastix mesnili</i>
		Sub-filo Sarcodina	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Entamoeba coli</i> <i>Iodamoeba Butschlii</i>
	Filo Apicomplexa	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Isoospora belli</i> <i>Cyclospora cayentanensis</i>	
Metazoários	Filo Platyhelminthes	Classe Trematoda	<i>Shistosoma mansoni</i> <i>S. haematobium</i> <i>S. intercalatum</i> <i>S. japonicum</i> <i>Fasciola hepaticva</i> <i>Fasciolopsis buski</i> <i>Paragonimus westermani</i>
		Classe Cestoidea	<i>Taenia saginata</i> <i>T. solium</i> <i>Echinococcus granulosus</i>
	Filo Nematelminthes	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Trichuris trichiura</i> <i>Enterobius vermicularis</i> <i>Strongyloides stercoralis</i> <i>Necator americanus</i> <i>Ancylostoma duodenale</i>	

As técnicas de exame de fezes, incluem a pesquisa quistos e trofozoítos de protozoários, ovos e larvas de helmintas. As técnicas mais comumente realizadas incluem exames macroscópicos, exames microscópicos a fresco, após concentração e após coloração, e ainda Testes serológicos imunocromatográficos (Tabela 31) (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

Tabela 31: Técnicas utilizadas para pesquisa de parasitas em amostras de fezes.

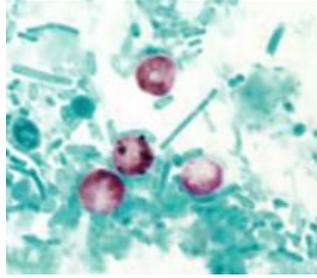
Exame macroscópico	Avalia a consistência, a presença de sangue, muco vermes e proglotis.
Exame Microscópico	<p>Exame direto a fresco</p> <p>A visualização de fezes no exame a fresco implica a montagem de lâminas com solução de iodo. Esta técnica tem algum impacto na pesquisa de trofozoítos e larvas móveis, no entanto também pode ser utilizada para detetar ovos de helmintas e quistos de protozoários, assim com diferenciar estas estruturas de células do hospedeiro, nomeadamente leucócitos (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).</p>
	<p>Técnica de Concentração: Método de Ritchie</p> <p>As amostras fecais devem ser concentradas por métodos de sedimentação com formalina-acetato de etilo. Esta técnica separa os ovos e os quistos da massa fecal, e melhora a visualização dessas estruturas no exame direto. Após a concentração, o material é corado com solução de iodo e examinado microscopicamente (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).</p>
	<p>Coloração Ziehl-Neelsen modificada</p> <p>Esta é uma versão modificada da coloração de Ziehl-Neelsen. Os parasitas são corados com carbofucsina básica e resistem à descoloração com soluções acido-alcálicas. O fundo é corado com azul metileno. Os parasitas aparecem em vermelho contra um fundo azul-claro. Esta técnica é utilizada para detetar microrganismos como o <i>Cryptosporidium</i>, <i>Cyclospora</i> e a <i>Isospora belli</i> (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).</p>
Testes imunocromatográficos	<p>Testes comerciais de imunocromatografia são utilizados para detecção de antígenos de <i>Giardia</i>, <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Cryptosporidium</i> nas fezes. A detecção de antígenos circundantes dos parasitas nas fezes fornecem um marcador adequado da presença da infecção ativa.</p> <p>Outros testes serológicos, como técnicas de Imunofluorescência, Ensaio Imunoenzimáticos, hemaglutinação e aglutinação em latex são utilizados para detetar anticorpos Ig G produzidos em infecções provocadas por <i>Leishmania spp</i> e <i>Echinococcus granulosos</i> e ainda para a cisticercose, fasciolose e amebiose.</p>

Tabela 32: Parasitas intestinais observados após técnicas de concentração-sedimentação (Figuras adaptadas de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018).

Quisto de <i>Giardia lamblia</i>	Quisto de <i>Entamoeba histolytica</i>	Ovo de <i>Taenia</i>	Larva rabditoide de ancilostomídeo
			

Tabela 33: *Cryptosporidium parvum* observado após técnica de coloração de Kinyoun. (Figura adaptada de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018).

Ooquistos de *Cryptosporidium parvum*



II. Outras amostras não fecais para pesquisa de parasitas intestinais

i. Amostras Perianais

A colheita de amostras perianais é frequentemente necessária para o diagnóstico de infecções por oxiúro (*E. vermicularis*) e ocasionalmente por *Taenia*. A fêmea do oxiúro deposita os seus ovos na região perianal durante o período noturno.

A colheita de amostra perianal consiste na preparação de uma lâmina com fita adesiva transparente, que é previamente pressionada firmemente sobre as pregas perianais esquerda e direita (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

ii. Urina

O exame de amostras de urina pode ser útil no diagnóstico de infecções causadas por *Schistosoma haematobium*. A detecção de ovos na urina pode ser realizada diretamente ou após concentração empregando a técnica da sedimentação por centrifugação. Os ovos podem ficar presos em muco ou pus e estão presentes com mais frequência nas últimas gotas de urina que em amostras obtidas no início do processo de micção. A produção de ovos de *Schistosoma* varia e por isso os exames devem ser realizados ao longo de vários dias (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

III. Sangue

O diagnóstico clínico de hemoparasitoses fundamenta-se grande parte na colheita de amostras de sangue realizadas no momento certo e no exame microscópico de esfregaços sanguíneos finos e/ou de gota espessa, preparados e corados através da coloração Giemsa. (Tabela 35) Alguns microrganismos podem ser detetados através de um exame a fresco, no entanto, a identificação definitiva, requer a visualização das suas características num

esfregaço corado (Zeibig, Elizabeth A. G., 2013). Para além disto, efetuam-se testes imunocromatográficos para a deteção de antígenos de *Plasmodium spp.*

As colheitas de sangue para a realização do esfregaço podem ser feitas a partir de sangue total fresco (obtido a partir do dedo ou do lóbulo da orelha) em tubos com EDTA. O sangue deve estar o mais fresco possível e deve ser analisado o quanto antes para evitar que, por um lado, haja distorção e perda dos parasitas no sangue, e por outro lado, haja a progressão da infeção (Zeibig, Elizabeth A. G., 2013). O melhor momento para a colheita de sangue para exames parasitológicos varia de acordo com o parasita em particular, e com o respetivo estágio do ciclo de vida (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).

Os parasitas que comumente parasitam o sangue estão representados na tabela 34.

Tabela 34: Espécies mais frequentemente observadas em hemoparasitoses.

Protozoários	Filo Sarcomastigophora	Sub-filo mastigophora	<i>Trypanosoma brucei</i> <i>T. cruzi</i> <i>Leishmania spp.</i>
	Filo Apicomplexa		<i>Plasmodium falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. malariae</i> <i>P. ovale</i>
Metazoários	Filo Nematelminthes		<i>Wuchereria Bancrofti</i> <i>Loa loa</i> <i>Brugia malayi</i> <i>Mansonella</i>

Tabela 35: Técnicas utilizadas para pesquisa de parasitas em amostras de sangue.

	Esfregaço de sangue em gota espessa; Esfregaço de sangue fino
Exame Microscópico	Técnica de coloração Giemsa
	A coloração de Giemsa combina o azul de metileno e a eosina. Os íons de eosina são carregados negativamente e coram os componentes básicos das células de laranja ou roxo, ao passo que o azul metileno cora as estruturas ácidas da célula em vários tons que variam entre o azul e o roxo. Os trofozoítos de apresentam um núcleo vermelho e o citoplasma azul-acinzentado (Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., e Pfaller, Michael A., 2014).
Testes imunocromatográficos	Testes comerciais de imunocromatografia são utilizados para deteção de antígenos de <i>Plasmodium spp.</i> A deteção de antígenos circundantes dos parasitas fornecem um marcador adequado da presença da infeção ativa.

Tabela 36: Parasitas do sangue observados em esfregaços finos e, esfregaços de gota espessa após coloração com Giemsa (Figuras adaptadas de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018).

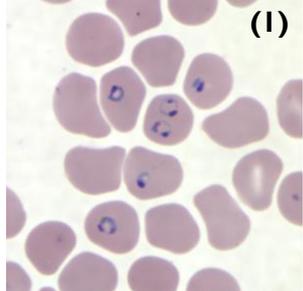
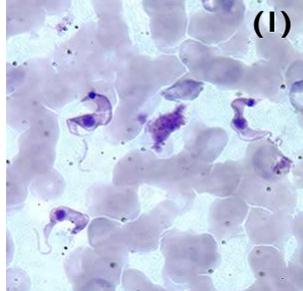
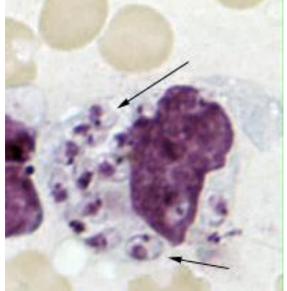
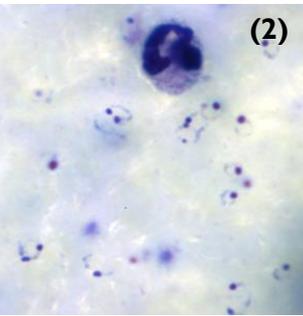
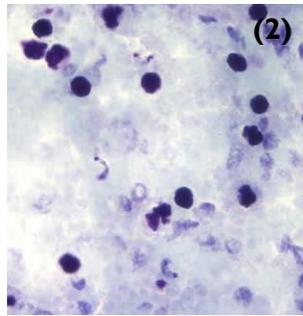
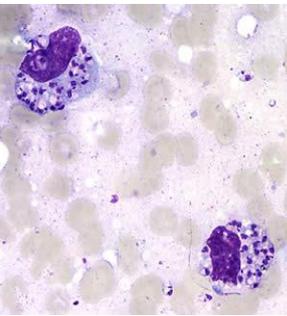
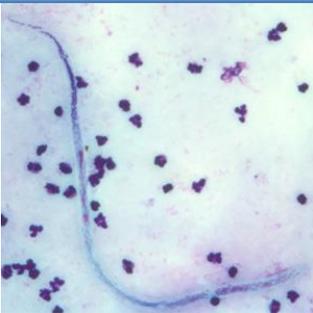
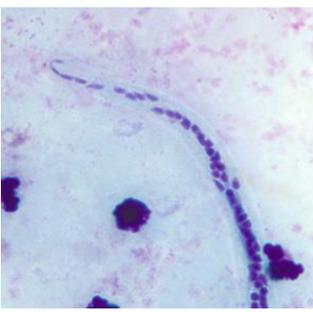
Trofozoítos em anel de <i>Plasmodium falciparum</i> em esfregaço fino (1) e em esfregaço de gota espessa (2) corados com Giemsa.	Formas tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> em esfregaço fino) e em esfregaço de gota espessa (2) corados com Giemsa.	Formas amastigota de <i>Leishmania spp</i> em esfregaço “de toque” de biopsia de uma lesão de pele corada com Giemsa.
 <p>(1)</p>	 <p>(1)</p>	
 <p>(2)</p>	 <p>(2)</p>	

Tabela 37: Parasitas sanguíneos observados em esfregaços de sangue de gota espessa corados com Giemsa (Figuras adaptadas de CDC: Centers for disease control and prevention, 2018).

Microfilária de <i>Wuchereria bancrofti</i> em esfregaços de sangue gota espessa corados com Giemsa.	Microfilária de <i>Loa loa</i> em esfregaço de sangue gota espessa, corado com Giemsa.	Microfilária de <i>Mansonella perstans</i> em esfregaços de sangue de gota espessa, corado com Giemsa
		
		

3.1.4 Laboratório de Virologia

O laboratório de virologia dos CHUC está concentrado no polo do Hospital Pediátrico. Tive a oportunidade de estar nesta secção durante uma semana e observar a rotina do laboratório. O laboratório possui um espaço amplo onde se processam e analisam a maioria das amostras e onde estão localizados os equipamentos anexos ao diagnóstico. Possui ainda um gabinete de validação, uma sala de microscópicos e uma sala para processamento de amostras especiais.

As amostras são levadas para o polo do hospital pediátrico através de transporte automóvel e assim que rececionadas são entregues ao laboratório de virologia por Assistentes Operacionais ou pelo sistema pneumático. As amostras analisadas estão de acordo com o tipo de infeção e a possível via de eliminação, sendo as mais comuns sangue, fezes, urina, secreções respiratórias e LCR.

Hoje em dia, os métodos utilizados no diagnóstico de doenças virais tornaram a identificação de vírus rápida e sensível. Os métodos utilizados incluem a utilização de anticorpos ou antigénios (como reagentes), a utilização de técnicas de genética molecular e sequenciamento genómico e testes multiplex que podem identificar vários agentes etiológicos. Através da análise destas amostras vírus, antigénios virais, genomas virais, efeitos citopatológicos induzidos por vírus em células, e claro, a avaliação da resposta imune do paciente ao vírus podem ser detetadas.

O laboratório de virologia possui uma sala de processamento e análise de amostras onde se encontram os equipamentos necessários ao diagnóstico laboratorial de infeções virais (Tabela 38). Existem agentes etiológicos e testes que são realizados rotineiramente, os quais estão descritos na tabela 39, assim como o método utilizado no diagnóstico.

Tabela 38: Equipamentos utilizados no laboratório de virologia.

QIAcube
EZI Advanced XL
Sistema Roche Cobas X 480
Rotor-Gene Q
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Auto-LiPA 48
7500 Fast Real-Time PCR System
GeneXpert® IV
FilmArray® Torch
AP22 Speedy

Tabela 39: Agentes etiológicos virais rotineiramente pesquisados e o método de diagnóstico utilizado.

Agente etiológico viral	Método utilizado no diagnóstico
HIV-1/ HIV-2: Vírus da Imunodeficiência Humana	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR em tempo real que permite também determinar a carga viral e efetuar testes de resistência à terapêutica antirretroviral. Pesquisa de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2.
HTLV-1 /HTLV-2: Vírus da Leucemia Humana das células T	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR.
HSV-1/HSV-2: Herpes Simplex	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR. Pesquisa de anticorpos anti-HSV do tipo IgM (reflete a infecção ativa e nas reativações).Reações cruzadas entre HSV-1 e HSV-2.
CMV:Citomegalovirus	Cultura do vírus por Shell Vial (Detecção de proteínas precoces/muito precoces).
HHV-6/ HHV-7: Herpes vírus humano	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR.
EBV: Vírus Epstein-Barr	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR.
VHA: Vírus da Hepatite A	Pesquisa de anticorpos anti-VHA da classe IgM para detetar infecção aguda, IgG para detetar infecção passada ou vacinação. Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR em tempo real que permite também determinar a carga viral e monitorizar a resposta ao tratamento.
VHB: Vírus da Hepatite B	Pesquisa de anticorpos anti-HBc (do tipo IgM reflete infecção aguda e do tipo IgG reflete infecção crónica ou passada) e anti-HBe que reflete o baixo nível de replicação viral. Pesquisa de antigénios AgHBs (marcador de infecção aguda ou crónica) AgHBe (marcador de infecção ativa).
Vírus da Hepatite C	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR em tempo real que permite também determinar a carga viral e monitorizar a resposta ao tratamento. Pesquisa de anticorpos anti-VHC.
Influenza vírus A Influenza vírus B Influenza vírus C	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR.
Rotavírus Norovirus Sapovirus Adenovirus Atrovirus	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR.
Papilomavirus Humanos Parvovirus	Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR. Pesquisa e identificação do genoma viral por PCR.

Os resultados obtidos são validados e postos à disposição do clínico que monitoriza o curso da doença e/ou que determina em conjunto com o doente qual a terapia que mais se adequa.

3.2 Secção Laboratorial de Imunologia

O laboratório de imunologia engloba os laboratórios de Imunologia, de autoimunidade e da serologia infecciosa. Estruturalmente, existem dois laboratórios onde se encontram os equipamentos utilizados na análise, duas salas de validação de resultados e uma sala de armazenamento e refrigeração. As amostras para análise imunológica são rececionadas e separadas na zona do Core Lab. Ao longo do dia os Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica dirigem-se várias vezes á zona de separação de amostras com o objetivo de trazer as amostras para o laboratório e iniciar o seu processamento.

3.2.1 Laboratório de Imunologia

No laboratório de Imunologia faz-se a determinação dos parâmetros imunoquímicos, proteinogramas, imunofixação sérica e urinária, e ainda testes a alergénios.

As amostras que mais frequentemente chegam ao laboratório de imunologia são sangue, urina e LCR.

3.2.1.1 Parâmetros Imunoquímicos

Para a determinação dos parâmetros imunoquímicos o laboratório de imunologia dos CHUC possui equipamentos automatizados. Os equipamentos utilizados encontram-se na tabela 40, e os parâmetros analisados por cada um deles, na tabela 41.

Tabela 40: Equipamentos utilizados na determinação dos parâmetros Imunoquímicos no laboratório de imunologia.

Equipamento	Tecnologia
BNII	Analisa proteínas no soro e na urina por Nefelometria
BN ProSpec	Analisa proteínas no soro e na urina por Nefelometria

Tabela 41: Parâmetros analisados pelos Equipamentos BN II e BN ProSpec.

Aparelho	Parâmetro
BN II	Imunoglobulina (Ig) A, G, M, E; β 2 Microglobulina; Albumina no soro e no LCR; Imunoglobulina G no LCR; κ e λ no soro e na urina
BN ProSpec	<p><u>Análises de rotina</u></p> Complemento C3 e C4; Fator reumatoide; Ceruloplasmina α 1 antitripsina; Apolipoproteína A e B
	<p><u>Análises especiais</u></p> Haptoglobina; Pré-albumina; Retinol binding Protein; Orosomucoide; α 2 Macroglobulina; Recetor solúvel da transferrina ; Lipoproteína a; Properdina fator B; Apolipoproteína E Cadeias leves livres λ e κ ; C1/ C1 I inibidor; Sub classes de IgG (G1,G2,G3, G4); Sub Classes e IgA (A1, A2); Cistatina C; Ig D; ADNase

3.2.1.2 Proteinograma

I. Princípio do Teste

Os proteinogramas são obtidos através da eletroforese de proteínas séricas. Esta análise é realizada com o objetivo de detetar anomalias no perfil eletroforético. A eletroforese em gel de agarose é muito utilizada pelos laboratórios devido á sua versatilidade e eficácia.

O laboratório de Imunologia dos CHUC utiliza os kits HYDROGEL 7, 15 e 30 da SEBIA. Estes géis são introduzidos no aparelho HYDRASYS, também da SEBIA, que aplica as amostras, realiza a migração eletroforética e a coloração. A visualização do gel é feita no aparelho HIDRASYS 2 SCAN.

Por rotina, as proteínas séricas são separadas em cinco frações principais as quais possuem mobilidade diferente, de acordo com a sua carga a um pH de 9,1 : Albumina, α 1 Globulinas, α 2 globulina, β -globulinas e γ -globulinas (Figura 6). As proteínas separadas são coradas com negro de amido e o excesso de corante é eliminado em meio ácido.

As eletroforeses resultantes são analisadas visualmente para determinar alterações do perfil e são avaliadas por densitometria, o que permite uma quantificação relativa e precisa de cada zona individual. É importante que a eletroforese de proteínas se faça acompanhar pelo doseamento das proteínas totais do soro (Keren, David F., 2003; Lecarrer, Didier, 2005)

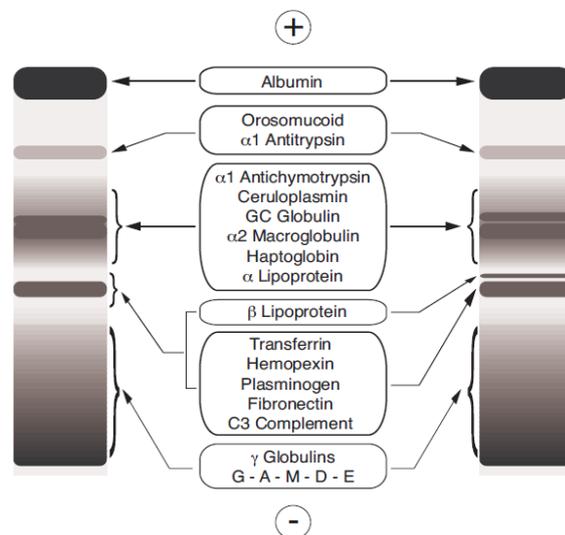


Figura 7: Perfil eletroforético pormenorizado (Figura adaptada de (Sebia, 2012).

II. Interpretação do perfil eletroforético

Em cada uma destas frações, identificadas pela eletroforese de proteínas séricas, migram diferentes proteínas de acordo com a sua carga: i) Albumina; ii) α 1-globulinas: orosomucóide e α 1-antitripsina; iii) α 2-globulinas: α 1-antiquimiotripsina, ceruloplasmina, GC globulina, α 2-macroglobulina, haptoglobulina e / α n-lipoproteína; iv) β 2-globulinas: β Lipoproteína, transferrina, hemopexina, plasminogéneo, fibronectina e complemento C3; v) γ -globulinas: imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina D (IgD) (Figura 6) (Keren, David F., 2003; Lecarrer, Didier, 2005).

Estas frações podem aparecer com alterações no seu perfil eletroforético, ou seja, com variações na intensidade das frações em consequência de algumas situações patológicas

(Tabela 42) ou situações não patológicas como presença de interferentes, má execução da técnica ou alterações no gel de agarose. Aqui torna-se evidente que para a interpretação de um proteinograma é necessário conhecimento preliminar das variações patológicas que podem existir relativamente às proteinémias.

Tabela 42: Modificações observadas nas frações como consequência de situações patológicas.

Aumentada	Diminuída
Fração Albumina	
Raro, pode aparecer associado a estados de desidratação; -Outras modificações: <u>Bisalbuminémia</u> ; -Congénita; Induzida por drogas; Pancreatites agudas	<u>Baixa de produção no fígado</u> (má nutrição, doença hepática grave); <u>Aumento da perda ou da degradação</u> (Síndrome nefrótico- perda renal, queimaduras- perda pela pele); <u>Hipercatabolismo</u> (Síndromes inflamatórias, Endocrinopatias- Síndrome de Cushing); Inflamação; Analbuminémia congénita.
Fração αI Globulinas	
Inflamação aguda e crónica; Neoplasias; Pós- Trauma ou cirurgia.	-Deficiência em α I antitripsina (deficiência congénita, doença Hepática e pulmonar).
Fração α2 Globulinas	
Aumento proteínas de fase aguda: <u>Ceruloplasmina e Haptoglobina</u> (Síndromes inflamatórias); <u>Aumento da α2 macroglobulina</u> (Síndrome nefrótico- associada a hipoalbuminemia, hiperbetaglobulinemia hipogamaglobulinemia).	Insuficiência hepatocelular, desnutrição; <u>Deficiência em ceruloplasmina</u> (D. de Wilson, má nutrição, Síndrome nefrótico, enteropatia com perda de proteína); <u>Deficiência de haptoglobina</u> (hepatopatias graves, anemias megaloblásticas, hemólise intravascular, anemia hemolítica).
Fração β globulinas	
Causas não monoclonais: <u>Aumento da transferrina</u> (anemia ferropénica gravidez e terapia estrogénica); <u>Aumento de β-lipoproteínas</u> (hipercolesterolémia de tipo II, hipotiroidismo, cirrose biliar, síndrome nefrótico e Diabetes Mellitus) <u>Aumento do C3</u> (Inflamação, obstrução biliar, hipertensão maligna, D. Cushing; Carcinomas); <u>Aumento da IgA de natureza policlonal</u> (cirrose alcoólica).	Insuficiência hepatocelular, desnutrição; <u>Diminuição da transferrina</u> (inflamação aguda, diminuição da síntese hepática); <u>Diminuição de C3</u> (deficiência genética).
Causas monoclonais: <u>Aumento da IgA</u> (mais frequente), <u>IgG</u> (no mieloma), <u>IgM</u> (D. Waldenstrom); <u>Cadeias leves livres κ e λ</u> (Mieloma das cadeias leves).	
Fração γ Globulinas	
Policlonais: Patologias hepáticas, infeções por bactérias, parasitas ou fungos; Doenças autoimunes.	Com a idade; Deficiência congénita ou adquirida; Tratamento imunossupressor; Mieloma de cadeias leves
Monoclonais: Gamapatias malignas (mieloma); Leucemia linfocítica Crónica; Linfomas.	
-Oligoclonais Doenças autoimunes (artrite reumatoide, S. Gougerot Sjögren, Lupus eritematoso, esclerose sistémica progressiva); Anticorpos de resposta a vírus (HIV, hepatites virais, meningites); Reações autoimunes a um transplante.	

A determinação de proteínas por eletroforese em amostras de urina providencia informação útil à cerca da localização (glomerular e/ou tubular) e do grau do dano no nefrônio, assim como a presença de proteínas monoclonais. A proteinúria depende tanto dos fatores intrínsecos à própria proteína como das alterações fisiopatológicas dos pacientes (Keren, David F., 2003).

3.2.1.3 Generalidades sobre gamapatias

I. Definição de gamapatia monoclonal

Uma gamapatia monoclonal caracteriza-se pelo aumento, muitas vezes, de um só tipo de imunoglobulina e de uma subclasse bem definida. Isto acontece á custa da proliferação de um clone de células B maligno ou hiperestimulado. As razões do aparecimento de uma gamapatia monoclonal ainda não estão bem claras e põem-se varias hipóteses: infecções virais, processos cancerígenos, estimulação antigénica repetitiva, fatores genéticos ou ambientais (Lecarrer, Didier, 2005).

O termo paraproteinémia refere-se a uma imunoglobulina de estrutura bioquimicamente normal, mas a qual é sintetizada em excesso em relação ao estado fisiológico. As gamapatias monoclonais também são frequentemente chamadas de disglobulinémias ou imunoglobulinas monoclonais (Lecarrer, Didier, 2005).

II. Estrutura geral de uma Imunoglobulina

As imunoglobulinas possuem uma região Fab e uma região Fc. A Região Fab constitui a região variável da imunoglobulina e onde se dá contacto antigénico. A região FC constitui a região constante que liga a recetores de superfície celular e a fatores do complemento. Na sua constituição possuem quatro cadeias, duas cadeias leves κ e λ , e duas cadeias pesadas da classe IgG, IgM, IgE, IgD ou IgA cada uma delas com regiões constantes e regiões variáveis ligadas por pontes dissulfureto. A sua estrutura básica está ilustrada na figura 7 (Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew;, e Pillai, Shiv, 2015).

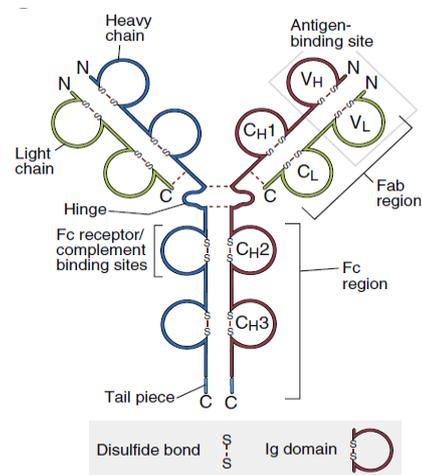


Figura 8: Estrutura ilustrativa da IgG (Figura adaptada de Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew; Pillai, 2015).

A mobilidade eletroforética das imunoglobulinas monoclonais é homogénea, aparece num pico (Figura 8), o que diferencia as imunoglobulinas monoclonais dos aglomerados policlonais ou das imunoglobulinas que migram em banda larga na região das γ Globulinas. O

pico também pode ser observado na região de migração de outras proteínas, como por exemplo na zona $\alpha 2$ Globulina, β Globulina e muito raramente na zona $\alpha 1$ Globulina (Figura 9) (Keren, David F., 2003).

Figura 9: Eletroforese de proteínas urinárias de um paciente com gamapatia monoclonal do tipo IgA κ (Figura adaptada de Keren, 2003).

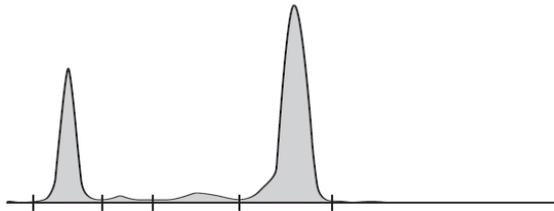
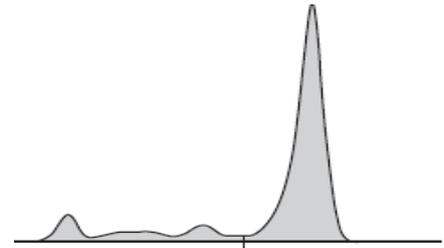


Figura 10: Eletroforese de proteínas séricas de um paciente com mieloma múltiplo (Figura adaptada de Keren, 2003).

III. Classificação de gamopatias monoclonais

i) Classificação baseada em critérios Imunoquímicos

Tabela 43: Tipos gamopatias classificadas de acordo com critérios imunoquímicos.

Hiperprodução seletiva de uma Imunoglobulina monoclonal completa

Constitui uma biossíntese anormal de imunoglobulina, normalmente IgG, IgA, IgM e mais raramente IgD e IgE. Esta gamapatia monoclonal maligna ou benigna, traduz-se em geral na existência de um pico monoclonal na eletroforese.

Hiperprodução de cadeia leves livres monoclonais

Constitui um aumento anormal da biossíntese de cadeias leves livre do tipo κ ou λ . Esta anomalia está exclusivamente presente no mieloma de cadeias leves, constantemente maligno. O pico monoclonal está geralmente ausente ou muito discreto na eletroforese do soro, exceto se existem polímeros de cadeias leves livres com um peso molecular muito elevado para passar no filtro renal. Uma hipogamaglobulinemia que acompanha as três classes de imunoglobulinas esta geralmente presente.

Hiperprodução de cadeias pesadas livres monoclonais estruturalmente anormais

É um tipo de gamapatia monoclonal de cadeias pesadas livres alfa, gama e mu. Presente em patologias raras malignas das cadeias pesadas livres. O diagnóstico é muito difícil, o pico monoclonal é inconstante na eletroforese do soro.

ii) Classificação baseada em critérios clínicos

Tabela 44: Tipos de gamopatias classificadas de acordo com critérios clínicos.

Gamopatias monoclonais malignas

- Mieloma Ig G, Ig A, Cadeias leves, raramente IgD, IgE, IgM
- Doença de Waldenström (IgM).
- Doença de cadeias pesadas alfa, gama, mu.

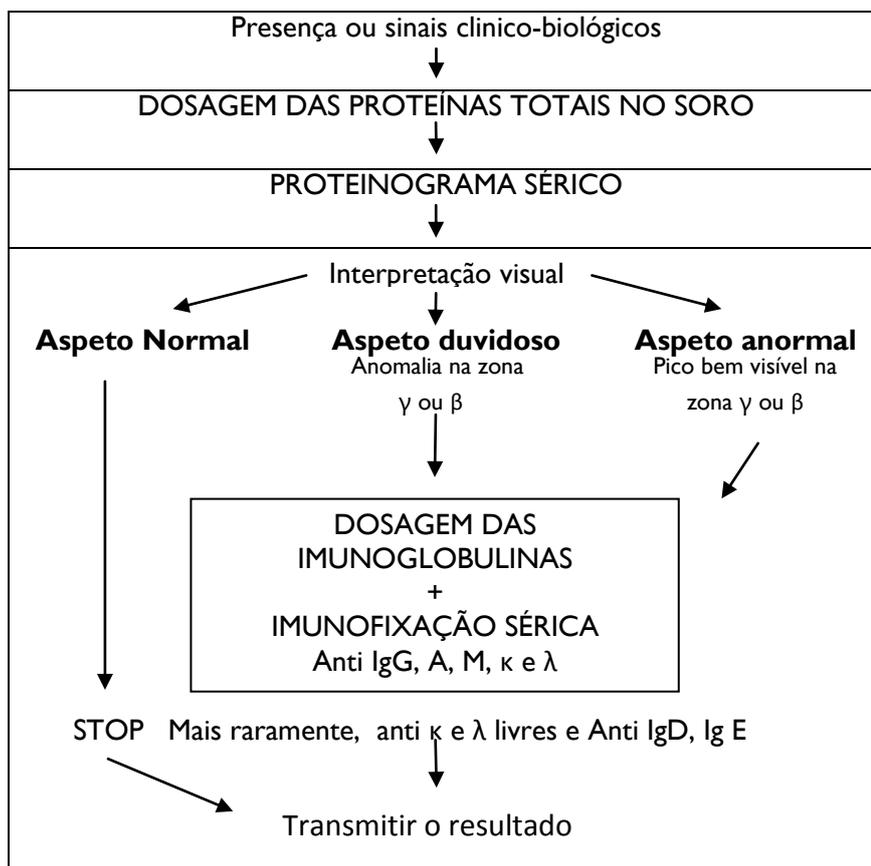
Aqui a Imunoglobulina monoclonal constitui um marcador tumoral de diagnóstico e de sobrevivência à doença.

Gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS)

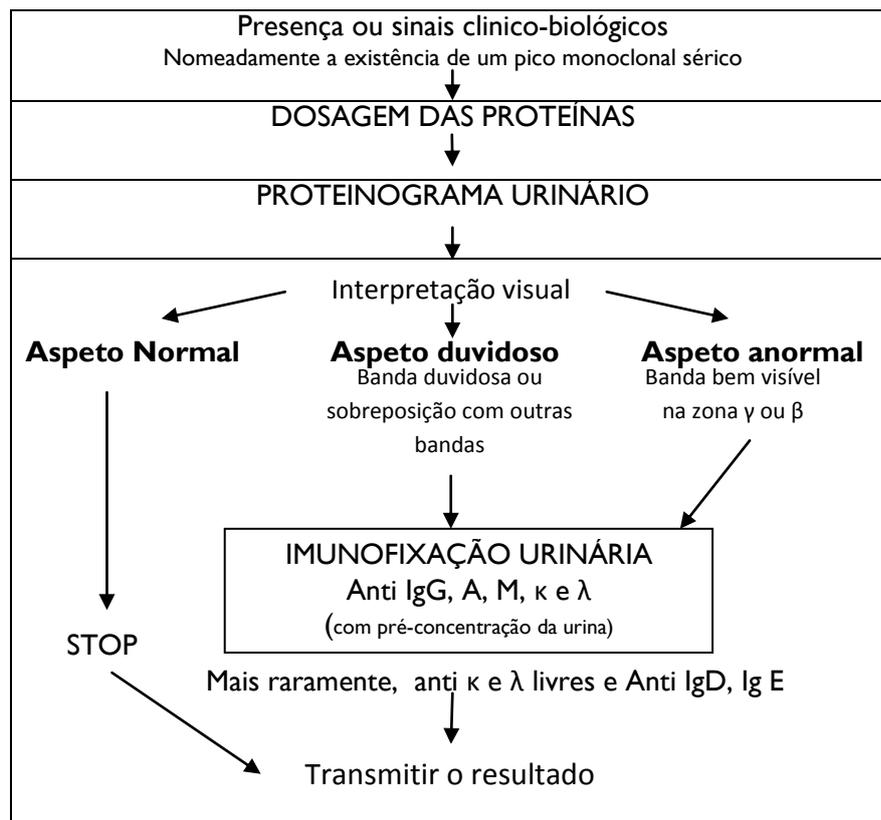
Incluem as IgG, IgM ou mais raramente as IgA. Existem dois tipos de MGUS: gamopatias monoclonais associadas a patologias malignas ou benignas em indivíduos jovens ou idosos; Gamopatias monoclonais idiopáticas, frequentemente assintomáticas, em indivíduos idosos.

IV. Etapas na identificação bioquímica de uma gamapatia Monoclonal

i) Sistema de investigação de uma gamapatia monoclonal no soro



ii) Sistema de investigação de uma gamapatia monoclonal na Urina



3.2.1.4 Imunofixação

I. Princípio do Teste

A imunofixação efetuada com a ajuda de antissoros monoespecíficos permite a identificação das bandas monoclonais detetadas por eletroforese.

A técnica é realizada em quatro etapas: 1) separação das proteínas por eletroforese em gel de agarose; 2) Fixação e imunoprecipitação das proteínas separadas por eletroforese: aplicação do fixador e dos antissoros diretamente sobre o gel. Os antissoros difundem-se no gel, e o fixador precipita todas as proteínas e os anticorpos correspondentes; 3) as proteínas solúveis, não precipitadas, são removidas do gel por lavagem e absorção com papel de filtro. As proteínas precipitadas são retidas no interior da matriz do gel. 4) Coloração das proteínas e comparação com a posição das bandas imunoprecipitadas com as bandas observadas após eletroforese de proteínas.

O Laboratório de Imunologia dos CHUC utiliza os géis de agarose HYDROGEL 1 IF, 2 IF, 4 IF, 9 IF e o sistema semiautomático HYDRASYS que realiza as etapas até à obtenção do gel para interpretação.

Para identificar de forma precisa a natureza das bandas monoclonais, as amostras são testadas simultaneamente em seis pistas. Depois da eletroforese a, pista de eletroforese

serve como referência, mostrando o perfil eletroforético das proteínas na amostra. As restantes cinco pistas permitem a caracterização das bandas monoclonais graças aos anticorpos específicos anti-cadeias pesadas gama (IgG), alfa (Ig A), e mu (Ig M), e anti cadeias leves κ e λ (livres e ligadas) (Keren, David F., 2003; Lecarrer, Didier, 2005).

II. Imunofixação sérica

A imunofixação sérica realizada nos CHUC, a pesquisa de proteínas monoclonais incide inicialmente sobre as imunoglobulinas do tipo IgG, IgM, IgA, assim como a respetiva correlação nas cadeias κ e λ . Se na observação da imunofixação inicial existirem bandas sem correspondência, realiza-se a pesquisa adicional de IgD e IgE e de cadeias leves livres.

III. Imunofixação Urinária

A imunofixação urinária tem como objetivo verificar a presença de uma imunoglobulina monoclonal na urina e determinar a natureza da Proteína Bence Jones. Na imunofixação urinária nos CHUC, a pesquisa de imunoglobulinas monoclonais incide sobre as imunoglobulinas do tipo IgG, IgM, IgA, assim como a respetiva correlação nas cadeias κ e λ ligadas ou livres.

3.1.2.5 Exames complementares

I. Pesquisa de crioglobulina

Certas Imunoglobulinas monoclonais podem complexar a baixa temperatura, dando origem a crioglobulinas monoclonais (Tipo I), ou complexar com outras imunoglobulinas dando origem a crioglobulinas mistas (tipo II) formando um precipitado de importância variável. Cerca de 10% das imunoglobulinas monoclonais associadas a mieloma ou a síndromes linfoproliferativas são crioglobulinas.

As crioglobulinas podem formar um gel, ou mais raramente, cristais que precipitam e solubilizam a 37°C.

Para pesquisa de crioglobulina o sangue tem que ser transportado e mantido a 37°C até chegar ao laboratório. O teste consiste em manter o soro a 4°C e observar pelo menos durante uma semana. O aparecimento de um precipitado, após a agitação suave do tubo, sugere a presença de crioglobulinas. A resolubilização a 37°C confirma a sua presença.

O doseamento é feito através do cálculo entre a diferença entre as taxas de IgG, M, A no sêrum a 37°C e dessas mesmas taxas depois da centrifugação e precipitação da crioglobulina a 4°C. A tipagem da crioglobulina é realizada por imunofixação e poderá revelar-se do tipo I, se monoclonal, ou do tipo II mista, se uma imunoglobulina monoclonal está associada a

imunoglobulinas policlonais. A presença de uma crioglobulina não é sinônimo de gamapatia monoclonal, podendo também aparecer noutras patologias (Lecarrer, Didier, 2005).

3.2.2 Laboratório de Autoimunidade

O laboratório de autoimunidade realiza Técnicas de Imunofluorescência Indireta, Ensaio Imunoenzimáticos, Quimiluminescência, Radioimunoensaio e Imunoblot no diagnóstico e controle e doenças autoimunes.

3.2.2.1 Generalidades sobre a patogênese autoimune

Uma das funções básicas do sistema imunológico é reconhecer e eliminar especificamente antígenos estranhos e, assim, proteger a integridade do organismo. Durante a maturação das células do sistema imunológico, ocorrem rearranjos e mutações somáticas de segmentos genéticos que codificam para os receptores de células T, células B e anticorpos. Durante este processo, o reconhecimento de autoantígenos desempenha um papel importante. Desenvolvem-se mecanismos de tolerância que previnem ou inibem reatividades potencialmente prejudiciais aos autoantígenos. Esses mecanismos de autodefesa são mediados ao nível da tolerância central e periférica, ou seja, as células T autorreativas são eliminadas por apoptose no timo, nos nódulos linfáticos, na circulação periférica ou ativamente suprimidas pelas células T reguladoras. Do mesmo modo, as células B autorreativas são eliminadas na medula óssea ou nos órgãos linfóides periféricos. Doenças infecciosas muitas vezes provocam autorreatividade com base na semelhança entre antígenos exógenos e autoantígenos. A autoimunidade induzida por infecção geralmente é autolimitada pela eliminação da célula ou organismo produtor de antígeno. No entanto, a autorreatividade pode ser sustentada por mimetismo molecular (isto é, homologia entre epitopos de antígenos exógenos e endógenos) e pela incapacidade do sistema imunológico para destruir células B ou T autorreativas via apoptose, anergia, ou outros mecanismos reguladores (Perl, Andras, 2014).

Portanto, a autoimunidade representa o resultado final da quebra de um ou mais mecanismos básicos de tolerância imunológica. No entanto, a autoimunidade não leva necessariamente à lesão tecidual. Autoanticorpos, como fator reumatoide ou anticorpos antinucleares, ocorrem em mais de 5% dos indivíduos normais, sem nunca resultar em artrite reumatoide (AR) ou lúpus eritematoso sistêmico (LES), que são caracterizados pela própria presença de tais reatividades de anticorpos. No entanto, a autoimunidade pode danificar quase todos os tecidos ou tipos de células do corpo. O espectro, gravidade e duração da doença variam amplamente. Dependendo dos sistemas orgânicos envolvidos, doenças autoimunes sistêmicas e específicas de órgãos foram delineadas (Perl, Andras, 2014)

Tabela 45: Doenças autoimunes sistêmicas, sistema de órgãos envolvidos e imunopatologia.

Doença	Sistema de órgãos envolvidos e imunopatologia
Lupus sistêmico eritematoso (SLE)	Todos, principalmente articulações, pele, vasos sanguíneos, membranas serosas, rim, pulmão, coração; anticorpos antinucleares (ANA).
Artrite reumatoide (RA)	Articulações, vasos sanguíneos, membranas serosas, pulmão; reumatoide fator.
Espondilite anquilopoiética	Axial > articulações periféricas, uveíte, aortite.
Esclerose Sistêmica	Pele, vasos sanguíneos, intestino, pulmão, coração, rim.
Psoríase	Pele e articulações.
Síndrome de Sjögren	Glândulas salivares e lacrimais, pâncreas, pulmão, rim; anticorpos SSA e SSB, infiltração linfocitária dos tecidos envolvido.
Dermatomiosite	Pele, músculo, vasos sanguíneos.
Doença inflamatória intestinal	Intestino pequeno e / ou grosso, articular, úvea; anticorpos anti-citoplasmáticos de granulócitos (ANCA) do tipo pANCA.
Granulomatose de Wegener	Inflamação dos vasos sanguíneos no rim, pulmão, pele; anti-citoplasmáticos de granulócitos (ANCA), do tipo cANCA.
Síndrome de Goodpasture	Rim, Pulmão, anticorpos anti-membrana basal glomerular.
Poliarterite nodosa	Inflamação dos vasos sanguíneos em todos os tecidos (tipicamente rim, pele, intestinos) exceto pulmão.

Tabela 46: Doenças autoimunes especificam de órgão, envolvimento típico e imunopatologia.

Doença	Envolvimento típico e imunopatologia
Diabetes mellitus Autoimune	Pâncreas; anticorpos anti-insulina e anti-glutamato-decarboxilase.
Esclerose Múltipla	Sistema nervoso central; reatividades de células T de anti-mielina e anticorpos.
Myasthenia gravis	Sistema nervoso periférico; anticorpo para o receptor de acetilcolina.
Tiroidite	Glândula tiróide; anticorpos anti-tiroidianos.
Uveíte	Uvea; anticorpo e mediada por células T.
Anemia Perniciosa	Estômago; anticorpo para o fator intrínseco necessário para a absorção de vitamina B12.
Pênfigo	Pele; anticorpo para a molécula de adesão intercelular desmogleína-3.
Penfigóide	Pele.
Vitiligo	Pele.
Miocardite	Coração.
Anemia hemolítica autoimune	Eritrócitos.
Trombocitopenia Autoimune	Plaquetas.
Púrpura trombocitopénica trombótica	Anticorpo para a clivagem fator von Willebrand Metaloprotease.
Cirrose biliar primaria	Fígado; desidrogenase piruvato marcada por anticorpos.
Hepatite autoimune	Fígado; citocromo P450 direcionado por anticorpos.

3.2.2.2 Imunofluorescência indireta(IFI)

I. Princípio do teste

Os métodos indiretos são usados predominantemente para pesquisar autoanticorpos contra proteínas conhecidas à superfície de células, órgãos e tecidos.

O primeiro passo é a ligação de um anticorpo para reagir com um antígeno, seguido de lavagem para a remoção do anticorpo não ligado, e posteriormente, a adição de um segundo anticorpo marcado com fluoresceína. Tecnicamente se a amostra for positiva, o primeiro anticorpo está presente no soro diluído e liga-se ao antígeno preso numa fase sólida. O Segundo anticorpo anti-anticorpo humano marcado com fluoresceína liga-se ao anticorpo primário e a visualização do complexo torna-se possível ao microscópico de fluorescência (Storch, Wulf B., 2000).

Os resultados são expressos com base em títulos de diluição de acordo com o tipo de anticorpo. Por exemplo, para a determinação de anticorpos antinucleares em adultos e crianças com idade inferior a 5 anos a base de titulação é, respetivamente, 1:160 e 1:80; A determinação de anticorpos do mosaico hepático é para adultos e crianças 1:100 e 1:40. Para amostras positivas a titulação prossegue-se em múltiplos do número até ao título de 1:1280.

A IFI é utilizada no laboratório de imunologia para determinar a presença qualitativa ou semiquantitativa de anticorpos antinucleares (ANA), de anticorpos anti-dsDNA, de anticorpos anti-músculo liso (ASMA), de anticorpos anti-micromossomas renais e hepáticos (anti-LKMI), anticorpos anti-mitocôndrias (AMA) e anticorpos anti-citoplasma de granulócitos (ANCA).

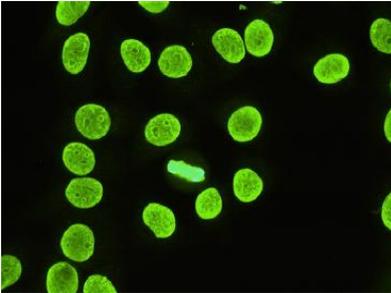
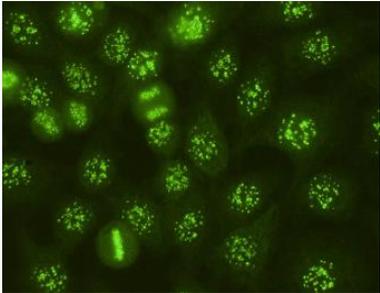
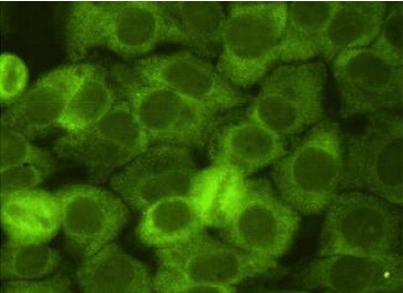
Os aparelhos utilizados na realização das técnicas de IFI são o IF Sprinter: equipamento de incubação automatizada, e o EUROPattern: equipamento de microscopia automatizada, que basicamente, reconhece os padrões e designa os títulos. No entanto, os resultados obtidos neste equipamento necessitam sempre da supervisão de um técnico superior de saúde ou de um patologista clínico para serem validados. Existem lâminas que são preparadas pelo equipamento MAGO da Erba Mannheim e observadas ao microscópio de fluorescência.

II. ANA's

A pesquisa de ANA's por IFI é realizada utilizando como substratos células HEp-2 (células da linha celular do carcinoma da laringe). Um grande número de autoanticorpos para estruturas celulares e organelos podem ser detetados por este método e por isso é considerado como método *gold standard* para a determinação de ANA's. As células HEp-2 são cultivadas em lâminas de vidro e distribuem-se uniformemente na lâmina o que permite a deteção de anticorpos conjugados ligados a qualquer estrutura da célula.

A observação da lâmina, por microscopia de fluorescência, após a incubação com a amostra do doente diluída, possibilita a distinção e a caracterização de membranas nucleares, nucleoplasmas, nucléolos, aparelho mitótico, complexos de Golgi, ribossomas, mitocôndrias e fibras do citoesqueleto. Através desta distinção obtém-se uma hierarquia lógica de padrões de coloração com base na localização na célula (Tabela 48), isto é, cada autoanticorpo causa uma fluorescência típica, que está padronizada, dependendo da localização do autoantígeno correspondente (Wiik, Allan S., Høier-Madsen, Mimi, Forslid, Jan, Charles, Peter, e Meyrowitsch, Jan, 2010).

Tabela 47: Exemplos de padrões de ANA's observados por IFI (Figuras adaptada de Wiik, Allan S., Høier-Madsen, Mimi, Forslid, Jan, Charles, Peter, e Meyrowitsch, Jan, 2010).

Padrão nucleoplásmico homogêneo (com nucléolos positivos)	Padrão anti-centrômero	Padrão citoplasmático difuso
		

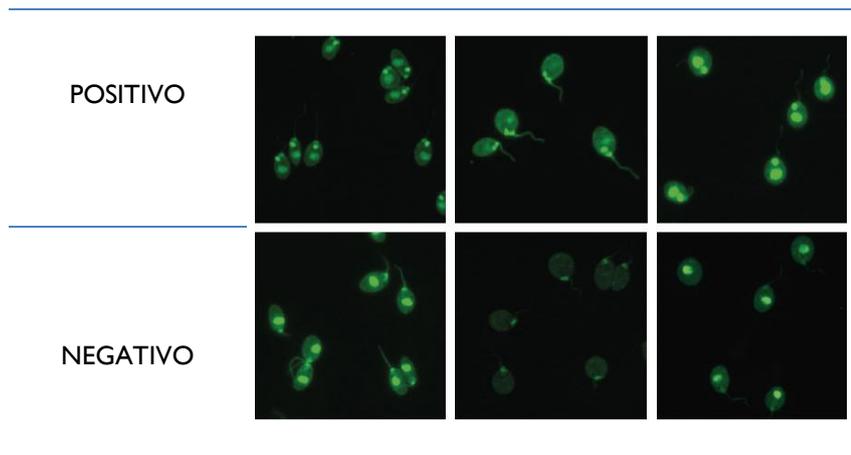
ANA's presentes no soro de pacientes são características de muitas doenças autoimunes, em particular, em doenças da forma reumática (Wiik, Allan S., Høier-Madsen, Mimi, Forslid, Jan, Charles, Peter, e Meyrowitsch, Jan, 2010).

Quando esta análise é positiva, testes com substratos contendo antígenos únicos são utilizados para diferenciação: Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Imunoblot.

III. Autoanticorpos Anti-dsDNA

A pesquisa de autoanticorpos anti-dsDNA por IFI utiliza como substrato o hemoflagelado *Crithidia luciliae*. Este método é considerado o gold standart para a detecção específica de anticorpos anti-ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla porque a *Crithidia luciliae* possui uma mitocôndria gigante que contem dsDNA (cinetoplasto) que para além de dsDNA, não exhibe outros antígenos que possam estar no núcleo da célula, e portanto, anticorpos que reajam com o cinetoplasto são exclusivamente direcionados para o dsDNA. Na observação microscópica de fluorescência de uma amostra com autoanticorpos anti-dsDNA é possível observar uma fluorescência homogênea, com uma borda acentuada, do cinetoplasto. Qualquer reação de fluorescência no núcleo do flagelado não é valorizada; a fluorescência no corpo basal do flagelado não tem qualquer significado. Autoanticorpos contra ssDNA não são visíveis no cinetoplasto (Tabela 49) (Aarden, L. A., Groot, Els R. d., e Feltkamp, T. E. W., 1975).

Tabela 48: Exemplos de imunofluorescências positivas e negativas na pesquisa de autoanticorpos anti-dsDNA utilizando o substrato de *Crithidia luciliae* (Figuras adaptadas Gerlach et al., 2015).



Autoanticorpos anti-dsDNA têm sido detetados no soro e em tecidos de pacientes com SLE. É importante a quantificação da concentração de autoanticorpos anti-dsDNA por diversos motivos: i) para diferenciar o SLE de outras patologias autoimunes relacionadas; ii) para monitorização da terapêutica; iii) para diferenciar SLE induzido por fármacos ou verdadeiros casos de SLE, uma vez que autoanticorpos anti-dsDNA não são detetáveis em doentes com SLE induzido por fármacos (Riboldi, Piersandro, Gerosa, Maria, Moroni, Gabriella, Radice, Antonella, Allegri, Flavio, Sinico, Alberto, Tincani, Angela, e Meroni, Pier Luigi, 2005).

O laboratório de autoimunidade utiliza FEIA para o screening e radioimunoensaio para o controlo e monitorização os seus pacientes. O radioimunoensaio é utilizado para a determinação quantitativa de autoanticorpos anti-dsDNA em soro humano.

IV. Mosaico Granulócito: ANCA

A pesquisa de autoanticorpos anti-citoplasma dos granulócitos por IFI, utiliza como substratos granulócitos fixados a laminadas com etanol e com formaldeído. Os ANCA's são marcadores específicos associados a vasculite sistémica.

Quando observados ao microscópico de fluorescência, os ANCA's fixados com etanol ou formaldeído, podem ter dois aspetos: cANCA- Padrão citoplasmático granular difuso; ou pANCA: padrão perinuclear liso (Figura 10). A fluorescência do tipo cANCA é causada por autoanticorpos anti-proteinase 3 (PR3) localizada no grânulo azurófilo. A fluorescência do tipo pANCA pode ser causada por autoanticorpos contra várias especificidades: autoanticorpos anti-mieloperoxidase (MPO), elastase, lactoferrina, lisozima, catepsina G, β -glucuronidase, azurocidina, H-lamp-2, α -enolase, defensina e outros antigénios, em parte não

identificados. É neste aspeto que a diferença entre a fixação com etanol ou com formaldeído é notória: na fixação com formaldeído, os anticorpos não reagem contra lactoferrina, lisozima, catepsina G e β -glucuronidase, tornando a análise de autoanticorpos contra mieloperoxidase mais específica (Radice, A. e Sinico, R. A., 2005).

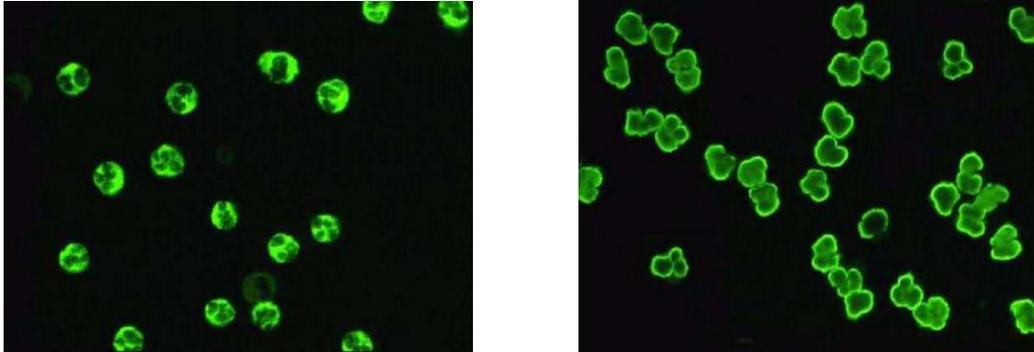


Figura 11: cANCA (direita) e pANCA positivos clássicos (esquerda). (Figuras adaptadas de Radice, A. e Sinico, R. A., 2005).

cANCA/PR3 são largamente encontrados em pacientes com vasculites sistémica, preferencialmente na Granulomatose de Wegener e pANCA/MPO associados Poliangite microscópica, glomeronefrite necrosante crescente idiopática e síndrome de Churg-Strauss (Radice, A. e Sinico, R. A., 2005).

Para uma melhor performance de diagnóstico, se a amostra for positiva a determinação de ANCA's por IFI é combinada com as determinações de PR3 e MPO por FEIA.

V. Mosaico Hepático: AMA, ASMA, anti-LKMI

A determinação qualitativa e semiquantitativa de autoanticorpos do fígado são cruciais para a classificação e diagnóstico de doenças autoimunes do fígado. As doenças autoimunes do fígado englobam: Hepatites autoimunes (HAI) tipo 1 e tipo 2, Cirrose biliar primária (CBP), Colangite esclerosante primária (CEP). Os anticorpos AMA, ASMA, LKMI E ANA desempenham um papel importante no diagnóstico de HAI e CBP. A HAI do tipo 1 caracteriza-se pela presença de ANA e ASMA; A HAI do tipo 2 caracteriza-se pela presença de LKMI e antigénio anti-citosol do fígado tipo 1 (anti- LC1) ; A CBP caracteriza-se pela presença de AMA e ANA; A CEP possui pANCA (Bogdanos, Dimitrios P., Invernizzi, Pietro, Mackay, Ian R., e Vergani, Diego, 2008).

- i. AMA: Utiliza como substrato rim de rato. Os AMAs coram fortemente o citoplasma das células dos túbulos distais que são ricos em mitocôndrias. AMAs também coram células peritais gástricas e muito fracamente hepatócitos e glomérulos (Bogdanos, Dimitrios P., Invernizzi, Pietro, Mackay, Ian R., e Vergani, Diego, 2008). Os anticorpos específicos da CBP do tipo AMA são dirigidos contra o componente M2 (família do ácido 2-oxo-desidrogenase). A determinação de ANA, em particular autoanticorpos anti-pontos nucleares (SPl00 e PML) e autoanticorpos anti-membrana nuclear gp210 podem ser também de relevância patológica.

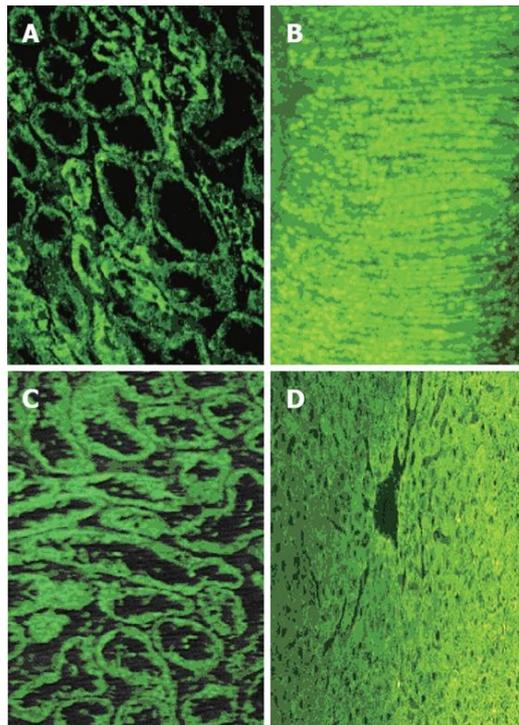


Figura 12: Anticorpo anti-microndrial (A e B) e ant-microsomas do fígado e do rim (C e D). (Figura adaptada de Bogdanos, Dimitrios P., Invernizzi, Pietro, Mackay, Ian R., e Vergani, Diego, 2008).

- ii. Anti-LKM1: Utilizam como substrato fígado de rato. Coram o citoplasma dos hepatócitos, tubos proximais renais e não coram células parietais gástricas (antigénio alvo citocromo p450 IID6). Este padrão característico em HAI (Figura 11) (Bogdanos, Dimitrios P., Invernizzi, Pietro, Mackay, Ian R., e Vergani, Diego, 2008).
- iii. ASMA: A determinação deste tipo de anticorpo implica a utilização de dois tipos de substratos, para além de fígado e rim: Células do estomago de rato e células VSM47. Se estiverem presentes, este tipo de anticorpos desencadeia uma fluorescência citoplasmática distinta da túnica muscular, bem como a lâmina muscular da mucosa e fibrilhas contráteis interglandulares da túnica mucosa. Se existirem autoanticorpos específicos anti-F-actina, o citoesqueleto das células VSM47 apresentam uma fluorescência filamentososa. Este padrão é observado em 80%-60% dos doentes com HAI do tipo I (Bogdanos, Dimitrios P., Invernizzi, Pietro, Mackay, Ian R., e Vergani, Diego, 2008).

3.2.2.3 Quimiluminescência

I. Princípio do teste

De forma simplificada, os testes de quimiluminescência envolvem três reações: i) captura do autoanticorpo de interesse da amostra pelo antígeno acoplado às esferas; ii) reconhecimento do autoanticorpo utilizando um anticorpo marcado com aminobutilisoluminol (ABEI); iii) medição quimiluminescente. O anticorpo conjugado marcado com ABEI na presença de H_2O_2 , um catalisador e a pH alto produz um flash de luz, que é medido como um valor numérico expresso em unidades de luz relativa (RLUs). As RLUs são proporcionais à quantidade de conjugado com ABEI que se liga ao autoanticorpo, que por sua vez é proporcional à quantidade de autoanticorpos ligados ao antígeno alvo ligado covalentemente às esferas. As RLUs são traduzidas pelo instrumento em concentração de autoanticorpo, através de uma curva de calibração (Mahler, Michael, Bentow, Chelsea, Serra, Josep, e Fritzler, Marvin J., 2016).

O laboratório de autoimunidade dos CHUC possui o aparelho Bioflash® da Inova Diagnostics.

II. Aplicações

Tabela 49: Alguns anticorpos determinados por quimiluminescência e doenças associadas.

Doença	Autoanticorpos
Síndrome fosfolipídico	Cardiolipinas IgG e IgM β 2 Glicoproteína IgG e IgM
Doenças reumatológicas	ENA 7: RNP, Sm, SS-A/Ro60, Ro52, SS-B/La, Scl-70 and Jo-1

As determinações feitas por quimiluminescência são utilizadas como rastreio, devendo efetuar-se a confirmação e o doseamento por ELISA.

3.2.2.4 Radioimunoensaio (RIA)

I. Princípio do teste

Um RIA é um imunoensaio de sensibilidade muito alta que utiliza antígenos alvo marcados radioativamente, maioritariamente com ^{125}I . A estes antígenos marcados são adicionados anticorpos específicos em quantidade conhecida e limitada. A amostra de soro é adicionada de modo a iniciar uma reação competitiva entre a preparação antígenos marcados e os antígenos não marcados presentes na amostra. A competição pelos anticorpos liberta uma certa quantidade de antígeno marcado. Esta quantidade é diretamente proporcional à quantidade de antígeno não marcado, ou seja, quanto mais antígeno não marcado estiver presente na amostra, mais anticorpos se ligarão, mais

antigénios marcados se libertam. Os antigénios ligados são separados dos não ligados, e a radioatividade dos antigénios remanescente livres no sobrenadante é medida. A partir de uma curva de calibração, pode-se aferir sobre capacidade ligante de antigénios presentes na amostra e a partir daí a quantificação de autoanticorpos (Wasmuth, Jan-christian, Gru, Barbara, Terjung, Brigit, Homrighausen, Angela, e Spengler, Ulrich, 2004).

II. Aplicações

Este método é utilizado para a determinação quantitativa de autoanticorpos anti-dsDNA em pacientes com SLE, embora também seja usado, entre outras aplicações, para a quantificação de autoanticorpos anti-insulina D e anti IA2 da Diabetes Mellitus tipo I e quantificação de autoanticorpos anti-recetor de acetilcolina na Miastenia Gravis.

3.2.2.5 Ensaios imunoenzimáticos.

I. ELISA

Os ensaios imunoenzimáticos baseiam-se na formação e deteção de complexos antígeno-anticorpo com recurso a enzimas (fosfatase alcalina; peroxidase) ligadas a anticorpos. A adição de um cromogéneo (substrato enzima) (p-nitrofenil-fosfato; O-phentlenediamina; tetramethylenzidina) resulta num produto corado que é medido por espectrofotometria.

ELISAs podem ser realizadas de muitas formas diferentes (direta, indireta, competitiva, captura etc.) No laboratório de autoimunidade é utilizada ELISA indireta: o antígeno está preso a um suporte solido. O antígeno primário, presente numa amostra positiva, é adicionado. Após a incubação o excesso de antígeno não ligado é lavado, e em seguida é adicionado o anticorpo secundário, específico para o anticorpo primário, que contém a enzima repórter. Após a lavagem é adicionado o cromogéneo e a cor resultante é medida por espectrofotometria. A cor resultante é diretamente proporcional á quantidade de autoanticorpos presentes na amostra. A partir de uma curva de calibração obtém-se a concentração de autoanticorpos (Emon Van, Jeanette M., 2007).

O laboratório de autoimunidade possui o equipamento automatizado Analyzer I da EUROIMMUN e o MAGO da Erba Mannheim para a realização de ELISA. O método é utilizado com o objetivo de determinar quantitativamente alguns -anticorpos.

II. Ensaio imunoenzimático fluorescente (FEIA)

O método FEIA é similar ao método de ELISA. A grande diferença entre estes dois métodos é no tipo de substrato e conseqüentemente a forma como é realizada a medição.

O método de FEIA utiliza um substrato fluorogénico para detetar a formação do complexo antígeno-anticorpo. A fluorescência resultante é diretamente proporcional á quantidade de autoanticorpos presentes na amostra. A partir de uma curva de calibração obtém-se a concentração de autoanticorpos presentes na amostra.

4. Conclusão

Em suma, os objetivos propostos, quer durante o tempo de estágio, quer na execução do relatório foram atingidos com sucesso.

Relativamente ao relatório de estágio, este destinou-se á consolidação dos conhecimentos obtidos durante todo o mestrado e à demonstração das atividades desenvolvidas principalmente nas áreas da Microbiologia e da Imunologia.

Durante este estágio curricular tive a oportunidade de percorrer dois caminhos distintos, porem intimamente relacionados: o caminho profissional e o caminho pessoal. O caminho profissional que se direcionou à aprendizagem prática e teórica, no qual tive a oportunidade de observar e participar de forma ativa na rotina das diversas secções de um laboratório, assim como aplicar e adquirir conceitos teóricos. O caminho pessoal, igualmente importante, uma vez que num laboratório tão grande como o do CHUC existe um leque variadíssimo de pessoas e de classes profissionais com as quais tive que aprender a lidar para conseguir tirar o melhor proveito possível do estágio.

Acredito que estes dois caminhos foram percorridos com êxito. Acabo este mestrado uma profissional mais consciente do mundo do trabalho que me espera, e claro, com mais conhecimentos na área das Análises Clínicas, mas também um ser humano mais capaz, com maior adaptabilidade, autonomia e sensibilidade.

5. Bibliografia

AARDEN, L. A.; GROOT, Els R. D.; e FELTKAMP, T. E. W. - Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 254:1 (1975) 505–515.

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew; e PILLAI, Shiv - **Basic Immunology: Functions And Disorders Of The Immune System**. 5th. ed. [S.l.] : Division, Elsevier - Health Sciences, 2015.

BOGDANOS, Dimitrios P.; INVERNIZZI, Pietro; MACKAY, Ian R.; e VERGANI, Diego - Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges. **World Journal of Gastroenterology**. 14:21 (2008) 3374–3387.

BROOKS, Geo. F.; CARROLL, Karen C.; BUTEL, Janet S.; MORSE, Stephen A.; e MIETZNER, Timothy A. - **Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. 26th. ed. [S.l.] : McGraw-Hill Education, 2013.

CAPPUCCINO, James G.; e WELSH, Chad - **Microbiology: A Laboratory Manual**. 11th. ed. [S.l.] : Pearson, 2017.

CDC: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **CDC - DPDx - Parasites A-Z Index** (2018). [Consult. 28 jul. 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/az.html>

EMON VAN, Jeanette M. - **Immunoassay-and-Other-Bioanalytical-Techniques.pdf**. [S.l.]: CRC Press, 2007.

FONSECA, Bruschy Ana; SEBASTIÃO, Clotilde; RIBEIRO CARVALHO, Maria Graça V.; CALHEIROS, Ismália; LITO, Luis; ABECASSIS, Margarida; PINTO, Margarida; SPENCER, Maria Odete; PINHEIRO, Maria Paula; COSTA, Maria Teresa; BARROS, Rosa Maria; e BENTO, Rosa Fula - **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. [S.l.] : Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA), 2004.

GERLACH, Stefan; AFFELDT, Kai; POTOTZKI, Lena; KRAUSE, Christopher; VOIGT, Jörn; FRAUNE, Johanna; e FECHNER, Kai - Automated evaluation of Crithidia luciliae based indirect immunofluorescence tests: A novel application of the EUROPattern-suite technology. **Journal of Immunology Research**. 2015.(2015).

HAIN LIFESCIENCE - **DNA•STRIP® technology** (2016). [Consult. 26 jul. 2018]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/technologies/dnastrip.html>

HAIN LIFESCIENCE - **GenoType Mycobacterium AS | Detection and differentiation of clinically relevant NTM** (2017). [Consult. 26 jul. 2018]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-as.html>

HAIN LIFESCIENCE - **GenoType Mycobacterium CM | Detection and differentiation of clinically relevant NTM** (2017). [Consult. 26 jul. 2018]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-cm.html>

lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-cm.html%0Ahttp://www.hain-lifescience.de/en/products/

HAIN LIFESCIENCE - **GenoType MTBDRplus | Detection resistance to rifampicin and/or isoniazid of MTBC complex** (2017). [Consult. 26 jul. 2018]. Disponível em: <http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdplus.html>

KEREN, David F. - **Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis**. [S.l.] : Hodder Arnold, 2003. ISBN 9780340812136.

KIRN, T. J.; MIRRETT, S.; RELLER, L. B.; e WEINSTEIN, M. P. - Controlled clinical comparison of BacT/Alert FA Plus and FN Plus blood culture media with BacT/Alert FA and FN blood culture media. **Journal of Clinical Microbiology**. 52:3 (2013) 839–843.

LECARRER, Didier - **Serum Protein Electrophoresis Immunofixation: Illustrated Interpretations [Hardcover]**. [S.l.] : Laboratoires Sebia, 2005.

MAHLER, Michael; BENTOW, Chelsea; SERRA, Josep; e FRITZLER, Marvin J. - Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. 38:1 (2016) 14–20.

MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C.; e MANUSELIS, George. - **Textbook of diagnostic microbiology, Fifth edition**. 5th. ed. [S.l.] : Elsevier, 2014.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; e PFALLER, Michael A. - **Microbiologia Médica**. 7th. ed. [S.l.] : Elsevier Ltd, 2014.

PERL, Andras - Autoimmunity: Methods and Protocols. **Methods in molecular medicine**. 102.(2014).

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; PROCOP, G. W.; e RINALDI, M. G. - Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. 45:11 (2007) 3522–3528.

PRESCOTT, Harley - **Laboratory Exercises in MICROBIOLOGY**. 5th. ed. [S.l.] : The McGraw–Hill Companies, 2002.

RADICE, A.; e SINICO, R. A. - Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). **Autoimmunity**. 38:1 (2005) 93–103.

RIBOLDI, Piersandro; GEROSA, Maria; MORONI, Gabriella; RADICE, Antonella; ALLEGRI, Flavio; SINICO, Alberto; TINCANI, Angela; e MERONI, Pier Luigi - Anti-DNA antibodies: A diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? **Autoimmunity**. 38:1 (2005) 39–45. dSEBIA - HYDRAGEL 7, 15 and 30 PROTEIN (E). (2012).

STORCH, Wulf B. - **Immunofluorescence in Clinical Immunology: A Primer and Atlas**. 1st. ed. [S.l.] : Springer basel AG, 2000.

WASHINGTON, John A. - **Laboratory Procedures in Clinical Microbiology**. 1th editio ed. [S.l.] : Springer-Verlag, 1981.

WASMUTH, Jan-Christian; GRU, Barbara; TERJUNG, Brigit; HOMRIGHAUSEN, Angela; e SPENGLER, Ulrich - ROC Analysis Comparison of Three Assays for the Detection of Antibodies against Double-Stranded DNA in Serum for the Diagnosis of Systemic Lupus Erythem- ". **Clinical Chemistry**. 50:11 (2004) 2169–2171.

WATTAL, C.; OBEROI, J. K.; GOEL, N.; RAVEENDRAN, R.; e KHANNA, S. - Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 36:5 (2017) 807–812.

WIJK, Allan S.; HØIER-MADSEN, Mimi; FORSLID, Jan; CHARLES, Peter; e MEYROWITSCH, Jan - Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. **Journal of Autoimmunity**. 35:3 (2010) 276–290.

WINN, Washington C.; ALEN, Stephen D.; JANDA, William M.; KONEMAN, Elmer W.; PROCOP, Gary W.; SCHRECKENBERGER, Paul C.; e WOODS, Gail L. - **Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas color**. 6th. ed. [S.l.] : Panamericana, 2006.

ZEIBIG, Elizabeth A. G. - **Clinical Parasitology: A Practical Approach**. 2th. ed. [S.l.] : Elsevier, 2013.

ZIMBRO, Mary Jo; POWER, David A.; MILLER, Sharon M.; WILSON, George E.; e JOHNSON, Julie A. - **Difco & BBL Manual: Manual of microbiological Culture Media**. 2th. ed. [S.l.] : BD diagnostics, 2009.