



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Catarina de Melo Ferreira

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Luxo Maia e pelo Dr. José Fleming Torrinha e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

Joana Catarina de Melo Ferreira

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Luxo Maia e pelo Dr. José Fleming Torrinha e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

“...o Laboratório é o verdadeiro santuário da ciência médica;
é apenas lá que o médico procura explicações para a vida,
no seu estado normal e patológico...”

Claude Bernard (1895)

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, porque sem o seu esforço não me teria sido possível prosseguir a minha formação académica e ter tido a oportunidade de frequentar este mestrado.

Agradeço também a todos os meus amigos por me terem apoiado ao longo deste percurso, celebrando as minhas vitórias e dando-me força para superar as dificuldades, fazendo com que eu mantivesse sempre os olhos postos nos meus objetivos.

Agradeço também ao Dr. José Fleming Torrinha e a toda a equipa do Laboratório Germano de Sousa por me terem recebido de braços abertos, por todo apoio e orientação que me foi dada desde o primeiro dia, pela excelente formação que me foi administrada, não só a nível profissional, mas também pessoal.

Por fim agradeço à Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Luxo Maia pela disponibilidade e orientação prestada na elaboração deste relatório. Também à Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa pela ajuda e empenho para que o meu estágio fosse a rampa de lançamento da minha atividade profissional.

Índice

1. Introdução	1
2. Caracterização do Laboratório de Estágio	2
2.1. Fluxo de Trabalho no Laboratório	2
2.2. Controlo de Qualidade	4
2.2.1. Controlo de Qualidade Interno	4
2.2.2. Avaliação Externa da Qualidade	4
3. Microbiologia	5
3.1. Aparelhos Automatizados	6
3.1.1. BACTEC 9050	7
3.1.2. VITEK 2 COMPACT	7
3.1.3. MICROSCAN WALKAWAY 96 PLUS	8
3.2. Meios de Cultura	9
3.3. Produtos Biológicos	11
3.3.1. Urina	12
3.3.2. Sangue	14
3.3.3. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	14
3.3.4. Exsudados urogenitais (Uretral e Vaginal)	15
3.3.5. Fezes	17
3.3.6. Fluídos normalmente estéreis	19
3.3.7. Exsudados Purulentos	19
3.3.8. Secreções do Trato Respiratório Inferior	20
3.3.9. Secreções do Trato Respiratório Superior	21
3.4. Micobactérias	22
3.5. Testes de Identificação Bacteriana	23
3.6. Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana	24
3.7. Caso Clínico	26
4. Imunologia	28
4.1. Equipamentos Automatizados	30
4.1.1. Imunoensaio Competitivo	32
4.1.2. Imunoensaio Não Competitivo (do tipo <i>sandwich</i>)	33
4.1.3. Imunoensaio de Captura de anticorpo	33
4.2. Marcadores Tumoriais	34
4.2.1. Antigénio Carbohidratado I9-9	34
4.2.2. Antigénio Carbohidratado I25	35

4.2.3. Antígeno Carbohidratado I5-3	35
4.2.4. α -fetoproteína	36
4.2.5. Antígeno Carcinoembrionário	36
4.2.6. Antígeno Específico da Próstata	37
4.3. Vírus da Imunodeficiência Humana	37
4.4. Hepatites Virais	41
4.4.1. Hepatite A	42
4.4.2. Hepatite B	43
4.4.2.1. Hepatite B Aguda	45
4.4.2.2. Hepatite B Crónica	47
4.4.3. Hepatite C	47
4.5. Citomegalovírus	49
4.6. Rubéola	51
4.7. Toxoplasmose	53
4.8. Caso Clínico	55
5. Conclusão	57
6. Referências Bibliográficas	59

Lista de Abreviaturas

Ac - Anticorpo

Ac Anti-CMV - Anticorpo contra o CMV

Ac Anti-HAV - Anticorpo contra o Vírus da Hepatite A

Ac Anti-HBc - Anticorpo contra o AgHBc

Ac Anti-HBe - Anticorpo contra o AgHBe

Ac Anti-HBs - Anticorpo contra o AgHBs

Ac Anti-HCV - Anticorpo contra o Vírus da Hepatite C

Ac Anti-HIV - Anticorpo contra o Vírus da Imunodeficiência Humana

Ac Anti-rubéola - Anticorpo contra o vírus da rubéola

Ac Anti-toxoplasma - Anticorpo contra o *Toxoplasma gondii*

ACT - α 1-antitripsina

AEQ - Avaliação Externa da Qualidade

AFP - α -fetoproteína

Ag - Antígeno

AgHBc - Antígeno da cápside do

AgHBe - Antígeno HBe do Vírus da Hepatite B

AgHBs - Antígeno da superfície/envelope do Vírus da Hepatite B

AMG - α 2-macroglobulina

BAAR - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BHI - Caldo Coração-Cérebro

CA - Antígeno Carbohidratado

CAM - Gelose Campylosel

CEA - Antígeno Carcinoembrionário

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CMLGS – Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa

CMV - Citomegalovírus

COS - Gelose de Sangue

CPSE - Gelose CPS Elite

CQI - Controlo de Qualidade Interno

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DRE - Exame Retal Digital

DST - Doenças Sexualmente Transmissíveis

EA - Éster de Acridina

ESBL - Beta-lactamases de Espectro Alargado
EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
fPSA - Antígeno Específico da Próstata livre
FSH - Hormona Folículo-Estimulante
FT3 - Tri-iodotironina livre
FT4 - Tiroxina livre
GN - Caldo GN
GRAN - Gelose Granada
HEKT - Gelose Hektoen
Ig - Imunoglobulina
LCR - Líquido Cefalorraquidiano
LH - Hormona Luteinizante
LJ - Meio Löwenstein-Jensen
MCK - Gelose de MacConkey
MHE - Gelose de Mueller-Hinton
MRSA - *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes
MSA2 - Gelose de Chapman
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NK - Células *Natural killer*
PMP - Partículas Paramagnéticas
PSA - Antígeno Específico da Próstata
PTH - Hormona Paratiroideia
PVX - Gelose de Chocolate (PolyViteX)
RLUs - Unidades Relativas de Luz
RNA - Ácido Ribonucleico
RT - Transcriptase Reversa
SEQC - *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*
SGC2 - Gelose de Sabouraud
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
T3 - Tri-iodotironina
T4 - Tiroxina
TODD H-T - Caldo Todd-Hewitt
TSA - Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana
TSH - Tiroestimulina

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

UK NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VCA3 - Gelose de Chocolate PolyViteX VCAT3

VHA - Vírus da Hepatite A

VHB - Vírus da Hepatite B

VHC - Vírus da Hepatite C

VHD - Vírus da Hepatite D

VHE - Vírus da Hepatite E

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

β-hCG - Gonadotrofina coriônica humana

Resumo

Neste relatório são descritas as atividades realizadas durante os 6 meses de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Este estágio teve lugar no laboratório Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CMLGS) inserido no Hospital CUF na cidade do Porto.

Com este estágio tive a oportunidade de me integrar e vivenciar a rotina de funcionamento de um laboratório de análises clínicas, tendo a oportunidade de adquirir experiência na execução de diferentes técnicas nas áreas de Bioquímica, Microbiologia, Imunologia e Hematologia bem como consegui aprofundar e consolidar todas as minhas bases teóricas ao presenciar a avaliação e interpretação de resultados. Tive ainda a oportunidade de aprender e observar na prática as estratégias para a gestão da qualidade de um laboratório.

Com este relatório pretendo fazer uma descrição genérica do funcionamento das quatro áreas, debruçando-me essencialmente na Microbiologia e Imunologia, valências escolhidas previamente ao início do estágio.

Palavras-chave: Análises clínicas; Microbiologia; Imunologia; Germano de Sousa; CUF

Abstract

This report, describes the activities undertaken under the period of 6 months during the internship for Master in Clinical Analysis, from Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). This internship was done at Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CMLGS) laboratory that is located at CUF Hospital in the city of Oporto.

With this internship I had the opportunity to work alongside the laboratory professionals and experience the day to day work of a clinical analysis laboratory, where I acquired the experience at executing different type of techniques related to Biochemistry, Microbiology, Immunology and Haematology as well as deepened and consolidate all my acquired theoretical knowledge by assisting with the evaluation and interpretation of results. Alongside all the described tasks I also had the opportunity to learn and observe in practice the strategies to ensure proper quality management of a clinical analysis laboratory.

With this report I intend to present a generic description of the functioning of four areas, while focusing mostly on Microbiology and Immunology, which were the selected subjects prior to the beginning of the internship.

Keywords: Clinical analysis; Microbiology; Immunology; Germano de Sousa; CUF

I.Introdução

Existem dados que remontam a 4000 a.C sobre a utilização de testes em amostras de urina, sendo provavelmente o ícone que marca o início da criação e evolução das análises clínicas. Atualmente o papel destes métodos de diagnóstico encontra-se totalmente revolucionado, existindo inúmeras áreas e cada vez mais específicas desde a hematologia e microbiologia à toxicologia clínica, havendo também todo um conjunto de produtos biológicos que podem ser estudados (urina, sangue, fezes, fragmentos de tecido, cateteres, válvulas cardíacas, entre muitos outros).

É do senso comum que as análises clínicas são uma ferramenta fundamental para o diagnóstico, prognóstico e monitorização de inúmeras patologias e o aumento da sua utilização pode diminuir de forma substancial os custos do tratamento.

As análises clínicas são dos principais meios auxiliares de diagnóstico usados pelos clínicos, tornando-se importante que os resultados sejam os mais exatos, precisos e fidedignos. Têm sido desenvolvidos métodos cada vez mais sensíveis e assertivos, muitas vezes integrados em equipamentos automatizados que processam um número elevado de amostras em curtos espaços de tempo, reduzindo a percentagem de erros humanos (logo, mais rentáveis em termos económicos), diminuindo também o tempo entre a colheita da amostra e a disponibilização do resultado, fator importantíssimo na evolução clínica dos doentes. Para assegurar esta qualidade de resultados torna-se imprescindível a presença de programas e estratégias de controlo da qualidade, quer interna como externa.

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra culmina com a realização de um estágio curricular cujo objetivo é preparar o aluno para o “mundo do trabalho”. Deste modo, todo o trabalho feito num laboratório pretende dar ao aluno toda a experiência necessária para colocar os ensinamentos teóricos lado a lado com a prática dos procedimentos estabelecidos e protocolados, consolidando a experiência na realização das diferentes técnicas.

O meu estágio foi feito no Laboratório Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa sediado no Hospital CUF, na cidade do Porto. Para além de todo o fluxo de trabalho de um laboratório e a respetiva interpretação dos resultados, tive ainda oportunidade de acompanhar a fase pré-analítica (atendimento do utente, colheita e transporte da amostra), parte do processo mais sujeita a erros devido ao enorme número de pessoas envolvidas. De acordo com o proposto, são explicadas em maior detalhe as áreas de Microbiologia e Imunologia, valências previamente escolhidas ao início do estágio.

2. Caracterização do Laboratório de Estágio

O grupo Germano de Sousa realiza análises clínicas há mais de 43 anos, tendo ao longo do tempo procurado dar respostas cada vez mais rápidas e melhores face à evolução e aos desafios da medicina. Contando atualmente com cerca de 450 postos de colheita distribuídos por todo o país, o laboratório tem ainda parcerias com empresas no âmbito da medicina do trabalho e alguns hospitais, fazendo também colheitas ao domicílio. O laboratório Germano de Sousa – Centro de Medicina Laboratorial integrado no Hospital CUF Porto tem como diretor técnico o Dr. José Fleming Torrinha, médico patologista clínico.

O laboratório assegura os resultados analíticos provenientes do posto de colheita, serviço de urgência, consultas externas e internamentos do hospital CUF, recebendo também amostras que provêm do instituto CUF e de inúmeros postos de colheita externos, contando com uma média de cerca de 700 amostras por dia, sendo este número variável consoante as alturas do ano.

O laboratório realiza ensaios nas principais valências analíticas: bioquímica, hematologia, microbiologia e imunologia, possuindo ainda uma área do laboratório apenas reservada ao serviço de urgência, área esta que possui os seus próprios equipamentos para garantir o melhor tempo de resposta. As amostras urgentes, ao contrário de todas as outras, não necessitam de passar pela sala de triagem, tudo em prol da disponibilização dos resultados uma vez que a evolução clínica dos utentes depende destes.

A principal preocupação do laboratório é fornecer resultados com qualidade de modo a satisfazer clínicos e utentes. Para isso é extremamente importante todas as medidas de gestão da qualidade e também uma boa formação da sua equipa de modo a aumentar a eficiência, facilitar a comunicação com o exterior e também estar sempre atualizado em relação aos avanços tecnológicos (novos testes, técnicas, equipamentos, entre outros).

2.1 Fluxo de Trabalho no Laboratório

Sabe-se que é na fase pré analítica que ocorre a maior parte dos erros que podem comprometer todo o resultado de uma análise, sendo fulcral que este processo seja efetuado com o maior rigor possível. É necessário confirmar as análises pedidas na requisição (esta se possível com algum historial clínico/motivo da análise para facilitar a interpretação dos resultados) e verificar se o utente reúne as condições necessárias à colheita, como por exemplo estar em jejum.

De seguida é preparado o material para efetuar a colheita e antes desta, confirma-se de novo os dados do utente e se este se encontra nas condições apropriadas para a colheita.

Após a recolha dos produtos biológicos, estes devem ser transportados até ao laboratório o mais rápido possível para processamento, de modo a garantir a viabilidade das amostras. As amostras provenientes do hospital são rapidamente processadas. As que vêm de postos de colheita externos são transportadas por estafetas devidamente acondicionadas em malas térmicas.

De salientar que a cada amostra é atribuído uma etiqueta com código de barras com código alfanumérico (Figura 1) que é lido pelos equipamentos que sabem logo quais as análises a que a amostra tem de ser submetida.

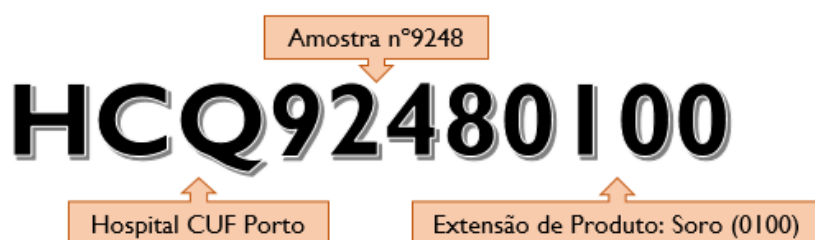


Figura 1: Esquema representativo do código alfanumérico atribuído às amostras no CMLGS

Ao chegarem ao laboratório todas as amostras passam por um processo de triagem de modo a que possam ficar registadas no sistema informático. É também aqui que se verificam as não conformidades (amostras vertidas, sem identificação ou mal etiquetadas, hemólise, volume insuficiente, etc.) para saber a aceitação ou rejeição da amostra. Os soros e os tubos destinados a provas de coagulação são centrifugados (3500min^{-1} durante 10min). É também nesta fase que se separam as amostras que têm de ser enviadas para laboratórios exteriores (CMLGS em Lisboa e o Laboratório Reference em Espanha) para realizar testes para os quais o laboratório não possui as metodologias necessárias.

Após este processo as amostras são distribuídas pelas suas respetivas áreas onde são realizadas as análises pedidas, a grande maioria em equipamentos totalmente automatizados.

Os resultados analíticos passam em primeiro lugar por uma validação a nível dos equipamentos, onde se comparam os resultados com os valores de referência e se efetuam repetições de alguns parâmetros se necessário, conforme padrões previamente estabelecidos. Posteriormente os resultados sofrem uma validação fisiopatológica pelos clínicos e farmacêuticos especialistas do laboratório onde são validadas a concordância entre os resultados de todas áreas e com o histórico clínico/patologia do utente.

O laboratório possui um sistema informático designado *Apollo*, que permite a integração de todos os postos de colheita, validação dos resultados dados pelos aparelhos, elaboração de folhas de trabalho (análises por fazer ou a repetir), histórico clínico dos utentes e permite ainda uma rastreabilidade das amostras.

2.2 Controlo de Qualidade

Para um laboratório garantir a máxima fiabilidade e rigor dos resultados preenchendo assim as necessidades dos utentes, torna-se fulcral que a entidade adote um sistema de gestão de qualidade. O grupo de Germano de Sousa aplica vários controlos de qualidade internos (CQI), estando também inserido em inúmeros programas de avaliação externa da qualidade (AEQ).

2.2.1 Controlo de Qualidade Interno

Cada setor tem as suas próprias estratégias no que diz respeito ao CQI. Estes controlos são nada mais que preparações comerciais onde a concentração de cada analito é conhecida, existindo sempre níveis normais e níveis patológicos. Alguns controlos são realizados diariamente e outros semanalmente, consoante a estabilidade dos reagentes e o número de vezes que aquele teste é requisitado. A partir dos dados fornecidos pelas bulas que acompanham os controlos, são desenhadas automaticamente nos equipamentos cartas de *Levey Jennings*, sendo os critérios de análise previamente estabelecidos pelo diretor técnico feitos com base nas regras de *Westgard*. As cartas são diariamente verificadas pelos responsáveis de cada setor, pelo responsável da qualidade e pela direção do laboratório, assegurando assim o rigor nos resultados dados aos utentes e facilitando a identificação de não conformidades.

2.2.2 Avaliação Externa da Qualidade

Os programas de AEQ permitem ao laboratório ter uma perceção do seu trabalho comparativamente com os outros laboratórios, fazendo uma avaliação crítica que tem a capacidade de alertar para eventuais erros e a necessidade de ações corretivas, em benefício da fiabilidade dos resultados.

Estas preparações comerciais são enviadas pelo laboratório responsável pela avaliação e são processadas como uma amostra normal. Pode-se aferir o desempenho de um certo método ou equipamento uma vez que a entidade responsável compara o resultado dado com o valor real da amostra e com os resultados obtidos por outras entidades participantes que usem as mesmas metodologias.

O laboratório CMLGS está inserido em vários programas de AEQ como o da *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC)*, *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)*, entre outros.

3. Microbiologia

Atualmente temos conhecimento da existência de diversos microrganismos capazes de provocar doença nos seres humanos. O laboratório de microbiologia clínica desempenha um papel fulcral no estudo destes microrganismos e da sua interação connosco, focando a sua atenção nos que são patogénicos (qual o mecanismo de doença e qual a terapia adequada). Nem todos os microrganismos causam uma doença específica, podendo um único agente ter várias manifestações de doença. Alguns são sempre patogénicos e outros só o são em certas circunstâncias. O desenvolvimento de uma infeção depende de inúmeros fatores como a suscetibilidade do hospedeiro, a virulência do microrganismo, entre outros [1].

Apesar de associarmos os microrganismos a estados de doença, a verdade é que possuímos um microbiota, ou seja, uma comunidade de microrganismos que coloniza um determinado indivíduo, variando de pessoa para pessoa e na mesma pessoa consoante o estado de saúde. O nosso microbiota é influenciado pela nossa alimentação, qualidade da água, uso de fármacos (salientando os antibióticos) e varia consoante as pressões ambientais a que somos sujeitos. Estes organismos desempenham um papel fulcral no bom funcionamento do nosso metabolismo e sistema imunitário, prevenindo ainda a colonização do nosso corpo por agentes patogénicos. Qualquer desequilíbrio que ocorra nesta comunidade deixa o nosso corpo mais suscetível a que espécies indesejadas se multipliquem e causem doença [1]. Os principais grupos de microrganismos encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Principais grupos de microrganismos e suas características principais [1]

Bactérias	Organismos procariotas; Duas formas básicas (Gram positivos (+) e negativos (-)); Tamanho, forma e tipo de agrupamento usados para identificação preliminar; Patologia provocada pela ingestão de uma toxina (intoxicação) ou pela invasão da bactéria nos nossos tecidos.
Fungos	Organismos eucariotas; Duas formas: unicelular (leveduras) e pluricelular/filamentosa (hifas), havendo fungos com as duas formas (dimórficos).
Parasitas	Organismos eucariotas complexos (uni e pluricelulares); Ciclos de vida complexos.
Vírus	Agentes infecciosos mais pequenos; Classificação consoante tipo de material genético (DNA ou RNA); Necessitam das células do hospedeiro para se conseguirem replicar.

Em suma, o objetivo do laboratório de microbiologia é conseguir identificar qual o microrganismo responsável pela doença e qual a terapia mais adequada para a combater, sendo isto por vezes uma tarefa difícil devido à contaminação com microbiota do próprio, tendo o

microbiologista o papel de conseguir discriminar o organismo responsável pela patologia, uma vez que não vai reportar tudo o que cresce [1]. Para o sucesso do diagnóstico torna-se fulcral que a amostra seja de boa qualidade (o que implica uma colheita adequada) e que o tempo entre a colheita e o processamento seja o menor possível de modo a garantir a recuperação do microrganismo implicado [2]. Uma boa colheita leva a uma melhor interpretação dos resultados, melhor evolução clínica do utente, diminuição do número de infeções hospitalares e ainda uma diminuição de custos. Na Figura 2 encontra-se sintetizado o fluxo dos produtos biológicos no laboratório de microbiologia.

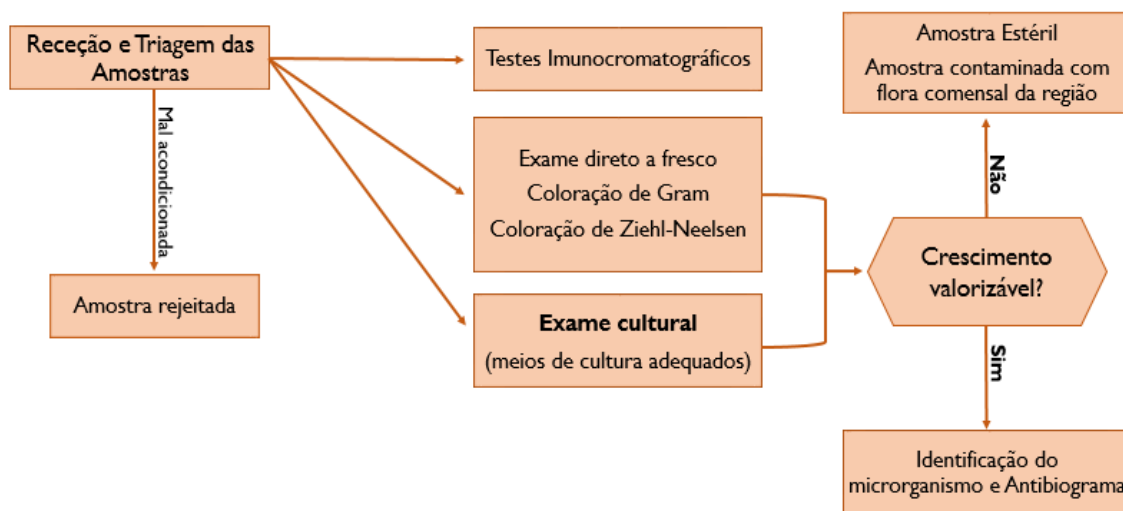


Figura 2: Fluxo dos produtos biológicos no laboratório de Microbiologia do CMLGS

3.1 Aparelhos Automatizados

Cada vez mais estão presentes nos laboratórios de análises clínicas aparelhos automatizados. O seu bom uso tem inúmeras vantagens como a diminuição de erros inerentes à mão humana e a maior rapidez e eficácia na obtenção dos resultados, o que traz benefícios quer clínicos (permitem ao médico iniciar a terapia adequada mais cedo, havendo uma melhor evolução clínica e conseqüente diminuição da taxa de mortalidade), quer económicos (menor tempo de internamento e menos gastos em tratamentos desadequados). A principal desvantagem destes equipamentos é retirar postos de trabalho uma vez que há menor trabalho manual envolvido [3]. A microbiologia é ainda uma área muito manual e apesar do seu nível de automatização ainda não ser muito elevado quando comparado com outras áreas, já existem aparelhos que realizam identificações e testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA).

3.1.1 BACTEC 9050

A invasão de um microrganismo na corrente sanguínea tem graves consequências (choque, falência de vários órgãos e até morte), sendo as septicemias consideradas das infecções mais graves. Tendo em conta tal facto, a rápida identificação do microrganismo responsável tem elevada importância no prognóstico dos doentes [4].

O BACTEC 9050 consiste num sistema automatizado para detetar o crescimento microbiano em hemoculturas. À medida que os microrganismos presentes metabolizam os substratos presentes no meio de cultura e consomem O_2 , é libertado CO_2 que vai ser detetado por um sensor presente na garrafa, uma vez que a quantidade de luz que é absorvida por um material fluorescente presente nesse sensor é afetada pela concentração deste elemento. Os detetores vão então medir esta fluorescência, e um aumento nesta é proporcional à concentração de CO_2 no meio [4].

Este equipamento agita continuamente as garrafas e vai rodando-as para serem lidas por um de três detetores. O aparelho monitoriza o sensor de cada garrafa de 10 em 10 minutos, ou seja, 144 vezes por dia. O tempo de incubação é de 7 dias a uma temperatura de $37^\circ C$ e ao fim deste tempo as culturas são consideradas negativas. A maior parte dos microrganismos significativos são detetados nas primeiras 48h [4], sendo emitido um sinal sonoro pelo aparelho para avisar da eventual presença de microrganismos viáveis. Quando isto acontece retira-se a garrafa e procede-se a uma subcultura em meios sólidos.

3.1.2 VITEK 2 COMPACT

O VITEK 2 é um aparelho que permite uma rápida identificação bacteriana e TSA para os isolados clínicos mais comuns [5], após a preparação de um inóculo standardizado [6].

São usadas cartas de utilização única (Tabela 2) que contém substratos para medir diferentes atividades metabólicas como acidificação, alcalinização, atividade enzimática e o crescimento microbiano na presença de certas substâncias [7], utilizadas para a identificação do microrganismo. Outras cartas possuem antibióticos para a realização do TSA, onde o equipamento regista a concentração mínima inibitória (CMI) para cada fármaco. Para isso é utilizado um sistema ótico que usa diferentes comprimentos de onda na zona do espectro visível para realizar leituras turbidimétricas e colorimétricas [5, 7].

Para a preparação destas cartas é necessário preparar uma suspensão bacteriana a partir de colónias puras em 3mL de solução salina (0,45% NaCl) com uma turvação equivalente a 0,5 McFarland. As cartas são inseridas no aparelho e carregadas através de um sistema de

vácuo [5], sendo posteriormente seladas e colocadas num carrossel de incubação. Estas são incubadas a 35°C e sujeitas a medições a cada 15 minutos [6].

O equipamento compara os resultados com uma base de dados tentando encontrar um microorganismo com o mesmo padrão de resultados do que queremos identificar, dando uma probabilidade de a sua identificação estar ou não certa. Se o quadro de resultados não for conhecido, ele indica uma lista de microorganismos possíveis ou simplesmente avisa da impossibilidade em identificar o microorganismo [7]. Em relação aos TSA ele determina o valor de CMI para cada antibiótico e interpreta os resultados com base nas normas da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, dizendo se a bactéria é resistente ou sensível a cada fármaco testado. O equipamento é ainda dotado de um sistema informático que interpreta e deteta padrões de resistência bacteriana como bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL).

Tabela 2: Esquema descritivo das diferentes cartas usadas no Vitek 2

Tipo de Carta	Nome	Microrganismos alvo
Identificação	GN	Gram (-)
	GP	Gram (+)
	YST	Fungos
	NH	Microrganismos fastidiosos
TSA*	N355	Enterobactérias
	N373	Enterobactérias não fermentadoras
	P648	Estafilococos
	P586	Enterococos
	ST03	Streptococos

*Nas cartas de TSA é necessário dizer ao equipamento qual a bactéria sujeita aos testes, ou então associar a carta de identificação (o equipamento associa a bactéria que identifica ao TSA)

3.1.3 MICROSCAN WALKAWAY 96 PLUS

O MICROSCAN WALKAWAY 96 PLUS trata-se de um aparelho automatizado para a realização de identificações e TSA em isolados microbianos. Tal como no VITEK 2, é necessária a preparação de um inóculo estandardizado. No laboratório, este aparelho encontra-se reservado aos isolados clínicos das amostras da rotina, essencialmente urinas [8].

Este equipamento utiliza painéis de microtitulação (Tabela 3) impregnados com substratos e antibióticos desidratados. A maioria dos painéis realiza simultaneamente a identificação e o TSA, mas alguns são destinados apenas à realização do TSA. A identificação é feita com base em provas bioquímicas, possuindo vários reagentes que são adicionados automaticamente pelo aparelho para efetuar a leitura dos painéis. Usando um leitor fotométrico, realiza uma leitura colorimétrica/turbidimétrica [9]. Uma das vantagens deste

equipamento é a possibilidade de retirar os painéis e fazer uma leitura manual dos mesmos, caso seja necessário confirmar resultados.

A preparação da suspensão microbiana é feita usando um “inoculador” estandardizado, diminuindo o tempo perdido no ajuste do inóculo à turvação pretendida. Após esta preparação, utiliza-se um instrumento que permite carregar os 96 poços do painel simultaneamente, ficando este pronto a entrar no equipamento, onde é incubado a 35°C.

Tal como no VITEK 2, este equipamento compara a leitura dos painéis com a sua base de dados, de forma a identificar o microrganismo presente, dando também uma probabilidade de a sua identificação estar ou não correta. O TSA determina a CMI, indicando se o microrganismo é suscetível ou não a cada um dos antibióticos testados com base nas normas EUCAST, fazendo também deteção de padrões de resistência bacteriana como ESBL ou bactérias produtoras de carbapenemases.

Tabela 3: Esquema descritivo dos diferentes painéis usados no MICROSCAN WALKAWAY 96 PLUS

Tipo de Painel	Nome	Microrganismos alvo
Identificação + TSA	NUC 69	Gram (-) (urinas)
	NC71	Gram (-) (<i>Pseudomonas spp.</i>)
	PC 42	Gram (+)*
TSA	NM44	Gram (-)* ¹ (essencialmente <i>Escherichia coli</i>)
	PM33	Gram (+)* ¹
Identificação	RY	Fungos
	HNID	Microrganismos fastidiosos (<i>Moraxella spp.</i> , <i>Neisseria spp.</i> e <i>Haemophilus spp.</i>)

*Necessário indicar ao aparelho se são estafilococos ou estreptococos (com base no resultado do teste da catalase)

*¹Necessário dizer ao aparelho qual a espécie de bactéria a ser testada

3.2 Meios de Cultura

O diagnóstico microbiológico baseia-se na recuperação do agente causador da infeção, sendo feito um exame cultural onde as amostras são inoculadas em meios de cultura e sujeitas a condições de incubação específicas. Os meios de cultura podem ser sólidos, onde visualizamos as colónias bacterianas ou líquidos, onde o aumento da turvação do meio nos indica que houve desenvolvimento microbiano. Existem os chamados meios não seletivos, que permitem o crescimento da maior parte dos microrganismos, meios de enriquecimento usados para aumentar o número de organismos numa amostra, meios seletivos cujo objetivo é favorecer o desenvolvimento de algumas bactérias e inibir o crescimento de outras

indesejadas (como o microbiota comensal) e por fim os meios diferenciais, muitas vezes cromogêneos, que contêm compostos que nos permitem auxiliar na distinção entre as diferentes colónias e nos orientar na identificação [1]. Os principais meios de cultura usados no laboratório de microbiologia encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Descrição dos vários meios de cultura usados no laboratório de microbiologia [1]

Gelose de Sangue (COS)	Meio nutritivo que permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos; A adição de sangue desfibrinado permite a visualização da ação hemolítica de algumas bactérias (α , β e γ).
Gelose de Chocolate (PVX)	Meio usado na recuperação de microrganismos fastidiosos (<i>Neisseria spp.</i> , <i>Haemophilus spp.</i> , etc.); O sangue adicionado ao meio basal ainda quente leva à lise dos glóbulos vermelhos tornando o meio castanho e tornando disponível nutrientes intracelulares como o fator X (hemina) e V (NAD- Nicotinamida adenina dinucleótido).
Gelose Mueller-Hinton (MHE)	Meio recomendado para realizar TSA pelo método de difusão em disco (método de Kirby-Bauer), tendo uma composição bem definida de modo a permitir a reprodutibilidade dos testes.
Gelose de Sabouraud (SGC2)	Meio usado na recuperação/isolamento de fungos (pH ligeiramente ácido); Possui gentamicina e cloranfenicol para inibir o crescimento bacteriano.
Gelose de MacConkey (MCK)	Meio seletivo para enterobactérias; A presença de sais biliares e cristal violeta inibe o crescimento de bactérias Gram (+); Distingue as colónias das bactérias fermentadoras da lactose (colónias rosa/avermelhadas) das não fermentadoras (colónias incolores) através da viragem de cor do vermelho neutro.
Gelose de Chapman (MSA2)	Meio seletivo para estafilococos (elevada concentração de NaCl); Meio diferencial para <i>Staphylococcus aureus</i> , uma vez que forma colónias amarelas devido à fermentação do manitol.
Gelose Campyloset (CAM)	Meio seletivo para a recuperação de <i>Campylobacter spp.</i>
Gelose de Chocolate PolyVitex VCAT3 (VCA3)	Meio seletivo para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> ; Possui os fatores V e X; Possui um conjunto de antibióticos (vancomicina, colistina, anfotericina B e trimetoprim) que inibe a maior parte das outras bactérias.
Gelose Hektoen (HEKT)	Meio seletivo usado para a recuperação de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> ; Gram (-) inibidos por sais biliares e corantes (azul de bromotimol e fucsina ácida);

	Bactérias produtoras de H ₂ S apresentam colónias com centro negro (devido à presença de citrato férrico amoniacal); Meio diferencial (colónias de interesse são transparentes uma vez que não fermentam a lactose).
Gelose Granada (GRAN)	Meio diferencial usado para a pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> (forma colónias alaranjadas); A presença de antibióticos inibe as bactérias Gram (-); O cristal de violeta inibe o crescimento de estafilococos.
Meio Löwenstein-Jensen (LJ)	Meio para cultura de micobactérias; O verde malaquite inibe crescimento de microrganismos que sobreviveram à homogeneização da amostra; Glicerol usado como fonte de carbono para favorecer o crescimento da <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em detrimento da <i>Mycobacterium bovis</i> .
Gelose CPS Elite (CPSE)	Meio diferencial e semi-quantitativo de microrganismos na urina; A elevada concentração de agar inibe a contaminação da placa pelo <i>swarming</i> do <i>Proteus spp.</i> ; Permite a identificação direta da <i>Escherichia coli</i> (colónias vermelhas) e a identificação presuntiva de <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Providencia spp.</i> e <i>Morganella spp.</i> .
Caldo Todd-Hewitt (TODD H-T)	Caldo de enriquecimento seletivo para estreptococos do grupo B.
Caldo coração-cérebro (BHI)	Caldo extremamente nutritivo que permite o crescimento de microrganismos exigentes.
Caldo GN (GN)	Caldo de enriquecimento seletivo para patogénicos entéricos.

3.3 Produtos Biológicos

Ao chegarem ao laboratório e antes do seu processamento, todos os produtos biológicos passam por um exame macroscópico, onde se verifica se a colheita foi feita no recipiente correto, se a requisição é do utente ao qual pertence aquela amostra e qual o tipo de análise pedida. Se forem reunidas todas as condições para se prosseguir com a análise e, se assim protocolado, são feitos esfregaços em lâminas para se efetuarem as colorações de Gram e/ou Ziehl-Neelsen. Estas colorações são fulcrais na avaliação da qualidade da amostra e permitem ter uma ideia dos microrganismos presentes e da presença de elementos figurados (leucócitos, eritrócitos, entre outros). São também preparados os meios de cultura necessários e feitas as sementeiras (sempre do meio menos para o mais seletivo).

No fim do tempo de incubação estipulado as placas são retiradas da estufa e observam-se as colónias (tamanho, forma, cor, cheiro, alterações de cor dos meios, entre outros). Estas características permitem determinar se o crescimento que ocorreu é valorizável no produto

em questão e, se sim, prossegue-se com a identificação do microrganismo e com o TSA, procedimentos estes feitos em equipamentos automatizados. Na Tabela 5 encontra-se resumido as principais amostras e quais os meios de cultura e condições de incubação utilizados.

Tabela 5 – Principais tipos de produtos biológicos, meios de cultura e condições de incubação usadas

<u>Produtos</u>	<u>Meios</u>		<u>Condições Incubação</u>		<u>Lâminas</u>		
	Líquidos	Sólidos	37°C Atm O ₂	37°C Atm 5% CO ₂	Gram	Ziehl	Fresco
Exsudado nasal		MSA2	MSA2				
Exsudado faríngeo		COS + disco de Bacitracina		COS			
Exsudado Vaginal/Uretral		PVX + VCA3 + SGC2	SGC2	PVX + VCA3	•		•
Exsudado Vaginal/Anal (pesquisa de <i>Streptococcus</i> do grupo B)	TODD H-T	GRAN (no dia seguinte)		GRAN			
Expetoração/secreções brônquicas		PVX + COS + MCK	MCK	PVX + COS	•	•	
Expetoração (pesquisa de Micobactérias)		LJ	LJ			•	
Fezes	GN	HEKT (dia seguinte)	HEKT				
Hemocultura		PVX + COS		PVX + COS	•		
Líquido cefalorraquidiano (LCR)		PVX + COS		PVX + COS	•	(se pedido)	
Líquidos estéreis	BHI	PVX + COS + MCK	MCK	PVX + COS	•	(se pedido)	
Exsudado purulento/ de ferida	BHI	PVX + COS + MCK + SGC2 (se pedido)	MCK + SGC2	PVX + COS	•	(se pedido)	
Urina		CPSE	CPSE				

3.3.1 Urina

Uma vez que as infeções do trato urinário são extremamente comuns, a urina é das amostras mais frequentes no laboratório de microbiologia. Estas infeções podem ocorrer ao nível do trato urinário inferior, sendo a cistite a mais comum e podem também atingir o parênquima renal, sendo designadas de pielonefrites [1]. A bexiga é estéril, mas a uretra é colonizada por um elevado número de microrganismos, o que faz do jato intermédio de urina a amostra mais adequada para análise [2].



Figura 3: Meio CPS Elite com colónias de *Escherichia coli* (<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

Esta colheita é normalmente feita pelo utente, sendo necessário dar-lhe as instruções necessárias para que o faça corretamente. Uma urocultura inclui duas partes: exame sumário da urina/urina tipo II e uma análise bacteriológica.

O exame sumário da urina e a visualização do sedimento urinário é feito no equipamento AUTION MAX AX-4030, que usa tiras de reagente para realizar uma análise semi-quantitativa da glicose, proteínas, pH, sangue, cetonas, nitritos, leucócitos, entre outros. Este equipamento encontra-se ligado ao SEDIMAX que tem um microscópico incorporado, permitindo-nos analisar o sedimento e visualizar os seus elementos figurados (leucócitos, glóbulos vermelhos, bactérias, fungos, células epiteliais, cilindros, entre outros), informações fulcrais para nos auxiliar no diagnóstico.

A urina é depois semeada com uma ansa de 1µL na gelose CPSE e incubada a 37°C durante 18-24h, podendo este tempo de incubação ir até as 48h. Este meio é diferencial,



permitindo-nos uma identificação direta da *Escherichia coli*, cujas colónias são avermelhadas (Figura 3) e identificação presuntiva de outras enterobactérias (Figura 4), o que permite a obtenção de resultados mais rápidos e uma diminuição nos custos da análise [10].

Esta análise é semi-quantitativa, sendo consideradas positivas as culturas com um ou dois microrganismos com um

Figura 4: Meio CPS Elite com colónias de *Proteus mirabilis* (<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

número igual ou superior a 10^5 UFC/ml (unidades formadoras de colónias). Uroculturas com mais de três microrganismos não têm qualquer significado, saindo o resultado como contaminação por microbiota comensal da uretra. Culturas onde não houve qualquer

crescimento são consideradas negativas. De salientar que cada caso é um caso e temos de ter em atenção o método de colheita e a informação clínica do utente para adaptarmos a nossa interpretação dos resultados.

A partir das uroculturas positivas procede-se à identificação e TSA à exceção da *E.coli*, onde apenas é realizado o TSA.

Agentes mais comuns: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Morganella morganii* e *Klebsiella pneumoniae* [1].

3.3.2 Sangue

O sangue é um fluido estéril, por isso qualquer desenvolvimento microbiano é sinónimo de infeção. Bacteriémia e funguémia são conceitos aplicados quando é evidenciada a presença de bactérias ou fungos, respetivamente, em circulação na corrente sanguínea [1]. As infeções são normalmente designadas por septicémias e são consideradas das patologias mais graves, sendo fulcral o seu correto e rápido diagnóstico [4].

As colheitas são feitas em garrafas de hemocultura e, uma vez que a quantidade de microrganismos em circulação é extremamente baixa, torna-se importante colher volume suficiente (cerca de 20mL-30mL em adultos) para aumentar as probabilidades de detetar o microrganismo responsável. É importante desinfetar muito bem a pele do doente antes da colheita para evitar a contaminação da amostra com a microbiota da pele, nomeadamente o *Staphylococcus epidermidis* [1].

As garrafas que chegam ao laboratório são imediatamente colocadas no BACTEC 9050. Ao fim do tempo de incubação definido (7 dias) as garrafas que não positivaram são consideradas negativas. Se o equipamento indicar que uma das hemoculturas é positiva, é feita uma subcultura a partir da garrafa para GS e PVX (incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂) e é feito ainda um esfregaço em lâmina para se proceder à coloração de Gram. É fulcral salientar que a valorização clínica dos resultados obtidos depende sempre do contexto clínico.

Agentes mais comuns: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* [1].

3.3.3 Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é considerado uma amostra de emergência médica, sendo as infeções a ele associadas, como a meningite, patologias muito graves e com elevadas taxas de mortalidade [1]. A colheita é feita por um clínico através de uma punção lombar,

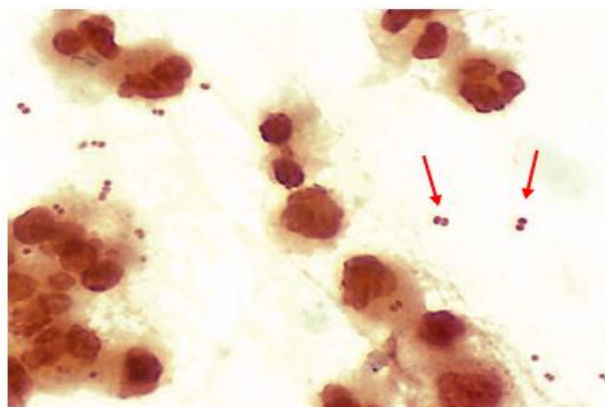


Figura 5: *Neisseria meningitidis* no LCR [1]

método extremamente invasivo. Dada a gravidade das patologias associadas a estas amostras, estas são processadas imediatamente aquando da sua chegada ao laboratório.

Antes de tudo é feita uma observação macroscópica onde se anota o volume e o grau de turvação da amostra. É feita uma sementeira a partir do produto centrifugado (para concentração dos microrganismos, caso estes existam) em GS e PVX (incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂) e um esfregaço em lâmina para se fazer a coloração de Gram (Figura 5) e de Ziehl-Neelsen (esta última só se pedida pelo clínico). Se for observado qualquer tipo de microrganismo o clínico deve ser imediatamente notificado, uma vez que se trata de um fluido normalmente estéril e o Gram já pode ajudar a orientar a terapia mesmo antes de sair o resultado do exame cultural (a presença de diplococos Gram negativos permite uma identificação presuntiva de *Neisseria spp.*) [1]. É feito também um exame citológico onde se faz uma contagem de leucócitos e de eritrócitos. Se houver algum crescimento nos meios de cultura é feita a identificação e TSA do microrganismo.

Agentes mais comuns: *Streptococcus* do Grupo B, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus* [1].

3.3.4 Exsudados Urogenitais (Uretral e Vaginal)

Os exsudados são normalmente colhidos em zaragotas que são transportadas em meio adequado de modo a manter a viabilidade dos microrganismos. Estas amostras são extremamente importantes para diagnosticar patologias como uretrites, vaginites e ainda doenças sexualmente transmissíveis (DST), uma vez que a percentagem de incidência destas últimas tem vindo a aumentar, tornando-se extremamente importante encontrar os portadores de modo a evitar a sua disseminação pela comunidade [11].

Os exsudados são inoculados em GS, VCA3 (pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*) e ainda SGC2 (pesquisa de *Candida albicans*), sendo as placas de GS e VCA3 incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Paralelamente é feita uma coloração de Gram de modo a avaliar a presença de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, leveduras, bactérias, entre outros. É feito ainda um exame direto para observação da mobilidade de *Trichomonas vaginalis*.

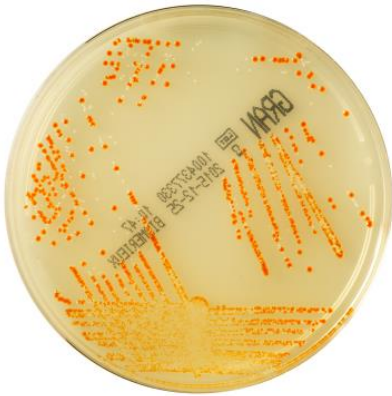
Para além da importância de detetar portadores da bactéria responsável pela gonorreia, há outra análise muito



Figura 6: Meio VCA3 com colónias de *Neisseria gonorrhoeae* (<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

requisitada no laboratório de microbiologia, a pesquisa de *Streptococcus* do grupo B (*Streptococcus agalctiae*) em exsudados vaginais/retais de mulheres grávidas.

Existe um elevado número de mulheres grávidas que são colonizadas na zona vaginal/retal por *Streptococcus agalactiae*. Isto torna-se um problema no momento do parto,



uma vez que há elevada probabilidade de o recém-nascido ser contaminado aquando da sua passagem pelo canal vaginal [12]. Esta bactéria é das principais causas de septicémias e meningites neonatais, com taxas de mortalidade a rondar os 40-80% [13, 14]. Por volta das 34-38 semanas de gestação é feita uma pesquisa deste microrganismo e se esta for positiva, é iniciada uma profilaxia para diminuir a probabilidade de contaminação do bebé e das consequências que esta acarreta.

Figura 7: Meio GRAN com colónias sugestivas de *Streptococcus agalactiae* (<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

Estas zaragatoas são, em primeiro lugar, inoculadas no caldo TODD H-T (meio de enriquecimento) que é incubado a 37°C cerca de 18h, sendo depois feita uma sementeira na gelose

GRAN a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Este meio é cromogéneo, permitindo uma identificação presuntiva de colónias de *S. agalactiae*, que adquirem uma cor alaranjada (Figura 7). O uso deste meio diminui o tempo necessário para a identificação e reduz ainda os custos, uma vez que só é feita a identificação das colónias sugestivas [14].

Existe um microbiota vasto associado a este tipo de produtos, havendo microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae* (Figura 6) ou *Haemophilus ducreyi* que são sempre patogénicos e outros tais como *Candida albicans* que até fazem parte do microbiota normal, mas, havendo algum tipo de desequilíbrio, o seu número aumenta e passam a causar uma patologia, neste caso uma candidíase [1]. Cabe ao microbiologista saber distinguir quais os microrganismos significativos para cada caso clínico, uma vez que este não vai identificar e reportar tudo o que crescer.

Agentes mais comuns: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*, *Streptococcus* do Grupo B (*S. agalactiae*), *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* *Gardnerella vaginalis* e *Treponema pallidum* [1].

3.3.5 Fezes

Apesar do intestino e o cólon serem das zonas do nosso organismo com maior microbiota associada (cerca de 10^{12} microrganismos/g de fezes) [15], a verdade é que as perturbações gastrointestinais como a diarreia continuam a ter elevada mortalidade e morbidade em grupos de risco como crianças e idosos [2]. Bactérias, toxinas, vírus e ainda parasitas podem ser responsáveis por este tipo de perturbações.

A coprocultura (exame cultural das fezes) é orientada para a pesquisa de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e, se pedido, *Campylobacter spp.*. Qualquer outra suspeita que o clínico tenha deve-o indicar na requisição de modo a que o diagnóstico possa ser encaminhado nesse sentido, uma vez que alguns microrganismos não são isolados rotineiramente nestes produtos. As bactérias *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* causam gastroenterite (com febre, vômitos e dores abdominais) e disenteria bacilar (febre e diarreia sanguinolenta) respetivamente [16] e o *Campylobacter spp.* provoca uma diarreia sanguinolenta com fortes dores abdominais [17, 18].

Para a pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* em primeiro lugar a amostra tem de ser inoculada num meio de enriquecimento, o caldo GN (incubado a 37°C) de modo a aumentar o número de microrganismos a isolar, sendo feita no dia seguinte uma repicagem para gelose HEKT (incubada a 37°C), um meio seletivo e diferencial onde as colónias de interesse adquirem uma cor transparente (não fermentadoras da lactose) e as colónias de *Salmonella spp.* adquirem ainda centro negro devido à produção de H₂S (Figura 8A).

Para a pesquisa de *Campylobacter spp.*, a amostra tem de ser semeada em CAM e incubada a 42°C numa atmosfera microaerofílica durante cerca de 5 dias [16]. As colónias desta bactéria (Figura 8B) adquirem uma forma típica em “chama de vela” devido à sua mobilidade e a observação das suas características morfológicas numa coloração de Gram orienta o microbiologista para prosseguir com a sua identificação.

É também extremamente comum surgirem requisições para a pesquisa de *Clostridium difficile* e das suas toxinas. Esta bactéria é um bacilo Gram positivo anaeróbio e oportunista responsável por surtos de diarreia e colite pseudomebranosa em hospitais, sobretudo em utentes sujeitos a antibioterapias. As infeções associadas a esta bactéria estão a aumentar de intensidade e severidade [19-21]. Esta bactéria produz ainda toxinas (A e B), que se pensa serem as responsáveis pelos sintomas. As toxinas são detetadas por ensaios imunocromatográficos e estes testes também detetam simultaneamente o glutamato desidrogenase, antigénio que existe na parede celular desta bactéria, tendo aproximadamente 100% de sensibilidade [22].

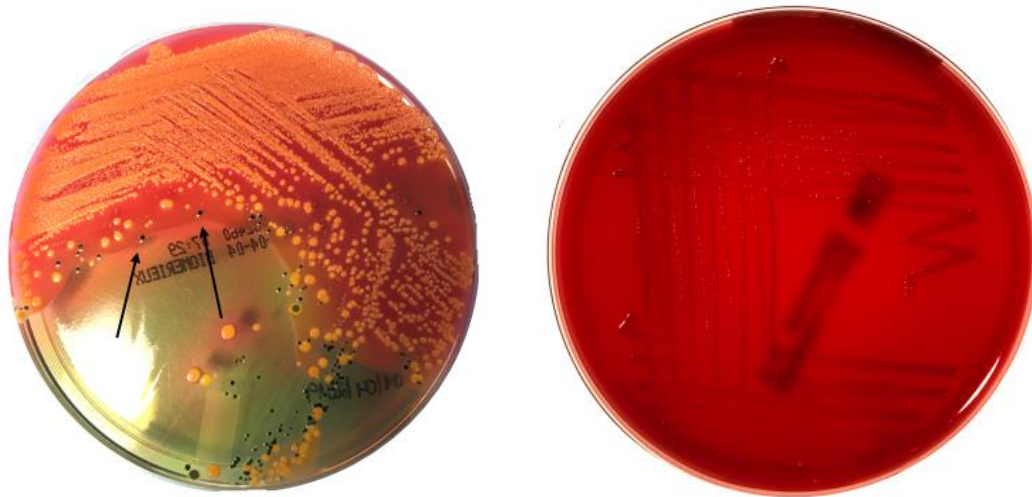


Figura 8: (A)-Meio HEKT com colônias sugestivas de *Salmonella* spp. (Microbiologia CMLGS) (B)-Meio CAM com colônias de *Campylobacter jejuni* (<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

A parasitologia é ainda uma área com bastante interesse num laboratório de análises clínicas, embora por vezes se pense em parasitas como um problema das regiões subdesenvolvidas. O exame parasitológico de fezes é um exame efetuado quase diariamente, sendo necessárias três amostras de fezes para sua realização [2]. Uma vez rececionadas as amostras, estas passam por um exame macroscópico, onde se observa a textura, cor das fezes e a eventual presença de muco,



Figura 9: Quisto de *Giardia lamblia* numa amostra de fezes (www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13526845219962)

sangue ou existência de parasitas ou fragmentos de estruturas parasitárias macroscópicas. O diagnóstico das parasitoses baseia-se essencialmente na deteção microscópica da morfologia das diversas estruturas parasitárias, sendo fulcral conhecer os seus ciclos de vida de modo a termos conhecimento de quais as formas que nos podem aparecer numa amostra [2]. Para este exame é usado um método de concentração, o método de Ritchie modificado, de modo a aumentar a probabilidade de encontrar quistos, ovos, larvas e ainda trofozoítos, principalmente em amostras onde estes existem em baixo número [23]. Esta técnica utiliza formaldeído a 10% como fixador e éter como solvente para extrair lípidos e detritos das fezes, sendo seguido de uma filtração e centrifugação de modo a concentrar os elementos parasitários no sedimento [23, 24].

Após este procedimento, é colocada uma gota de amostra concentrada entre lâmina e lamela. Esta é observada primeiramente com a objetiva de 10x e depois com a de 40x, sendo fulcral que toda a lâmina seja visualizada. Os parasitas mais encontrados são a *Giardia lamblia* (Figura 9), *Entamoeba histolytica* e ainda *Cryptosporidium* spp. [2].

Agentes mais comuns: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia spp.*, *Clostridium difficile* e *Escherichia coli* [1].

3.3.6 Fluidos normalmente estéreis

Para além do sangue e LCR anteriormente discutidos, outros fluidos normalmente estéreis incluem líquido ascítico, pericárdico, peritoneal, pleural e sinovial. Qualquer crescimento microbiano deve ser valorizado, podendo uma grande variedade de microrganismos estar associada a infeções destes fluidos. A realização de colorações de Gram e de Ziehl-Neelsen (esta última só se pedida) são fundamentais para nos orientar na identificação do agente responsável [1].

Estas amostras são inoculadas no caldo de enriquecimento BHI e nos meios sólidos PVX, COS e MCK, incubados a 37°C e os dois primeiros meios incubados numa atmosfera com 5% de CO₂. Qualquer microrganismo que cresça é identificado e realizado o seu TSA.

3.3.7 Exsudados Purulentos

Os exsudados purulentos englobam exsudados/pus de feridas, abscessos ou fístulas, locais que podem ser facilmente colonizados por microrganismos oportunistas [1]. Estes produtos podem ser colhidos em seringas, frascos e zaragatoas, no entanto, este último método de colheita deve ser evitado devido à elevada probabilidade de contaminação com bactérias existentes na superfície da ferida, que nada se relacionam com o microrganismo responsável pela infeção.

É necessário fazer esfregaços de modo a se observar o Gram para ter ideia do tipo de organismos que se encontram na amostra para nos auxiliar na identificação. Estes produtos são inoculados em BHI, PVX, COS, MCK e SGC2 (este último só se pedido pelo clínico), incubados a 37°C e o PVX e COS são incubados numa atmosfera com 5% de CO₂. Neste tipo de amostras é extremamente importante sabermos qual foi o método de colheita utilizado e qual o local de onde a amostra provém para nos facilitar a interpretação dos resultados, de modo a distinguirmos colónias potencialmente patogénicas de microrganismos comensais daquela zona, para não reportarmos microrganismos contaminantes e aumentar a exposição do utente a antibióterapias desnecessárias que criam condições para o desenvolvimento de resistências bacterianas.

Agentes mais comuns: *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa* e Bacilos Gram Negativo [1].

3.3.8 Secreções do Trato Respiratório Inferior

As infeções do trato respiratório inferior como a bronquite ou a pneumonia são das mais preocupantes a nível de saúde pública, sendo das principais causas de morte a nível mundial. A amostra mais comum que chega diariamente ao laboratório é a expectoração, devendo a colheita ser feita de manhã através de tosse profunda, uma vez que, devido à acumulação de secreções durante a noite, a amostra vai ser mais representativa, aumentando as hipóteses de isolar o microrganismo responsável [1]. Outros produtos biológicos englobam aspirados brônquicos, lavados bronco-alveolares e ainda fluído pleural.

Neste tipo de amostras é fulcral a realização de uma coloração de Gram não só para observação de potenciais microrganismos patogénicos, mas também para avaliar a qualidade da amostra através da contagem de neutrófilos e de células epiteliais, sendo apenas processadas amostras consideradas de “boa qualidade” (Figura 10). Na observação microscópica na objetiva de 10x, seguindo as diretrizes das tabelas de Murray e Washington, a amostra só é aceite se forem observadas menos de 10 células epiteliais e pelo menos 25 neutrófilos por campo (Figura 10A). As células epiteliais encontram-se no trato respiratório superior e a sua presença em número elevado numa amostra indica que houve contaminação com conteúdo orofaríngeo (e seu microbiota associado), sendo necessário rejeitar a amostra [1]. Para além da coloração de Gram, é feita ainda a coloração de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR).

Após se verificar que a amostra pode ser processada, esta é inoculada em PVX, COS e MCK que são incubados a 37°C. Os dois primeiros meios de cultura são incubados numa atmosfera com 5% de CO₂. A gelose de chocolate é usada essencialmente para a deteção de *Haemophilus influenzae* e a gelose de sangue permite observar a β-hemólise do *Staphylococcus aureus* e a α-hemólise no caso do *Streptococcus pneumoniae*, sendo este último um dos principais agentes etiológicos da pneumonia. É possível chegar a uma identificação presuntiva desta bactéria através da colocação de um disco de optoquina no meio, antibiótico à qual esta é sempre sensível (S) [2].

Neste tipo de amostras as culturas são interpretadas conjugando a observação feita no Gram com os tipos e números relativos de colónias que cresceram e ainda a informação clínica do utente, sendo fundamental distinguir potenciais microrganismos patogénicos de microbiota

comensal, evitando tratamentos mal direcionados ou até mesmo desnecessários. Colónias sugestivas são identificadas e é feito o seu TSA.

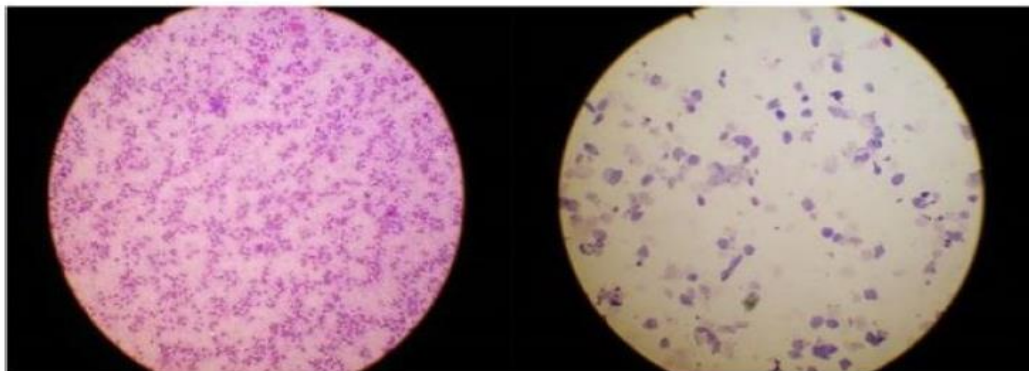


Figura 10: (A)- Amostra de expetoração com boa qualidade (elevado número de leucócitos)
(B)- Amostra de expetoração de má qualidade, com elevado número de células epiteliais [25]

Agentes mais comuns: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* do tipo b, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Enterobacteriaceae* [2].

3.3.9 Secreções do Trato Respiratório Superior

Existem poucas doenças graves a afetarem o trato respiratório superior, sendo as mais comuns a faringite e a sinusite. No entanto, alguns microrganismos podem colonizar estes locais e provocar patologias graves noutras zonas do nosso organismo. Exsudados nasais e orofaríngeos são produtos que chegam praticamente todos os dias ao laboratório.

Os exsudados da faringe devem ser colhidos com precisão de modo a evitar a contaminação da zaragatoa com saliva, sendo usados para o diagnóstico da faringite que tem como principal agente etiológico o *Streptococcus*

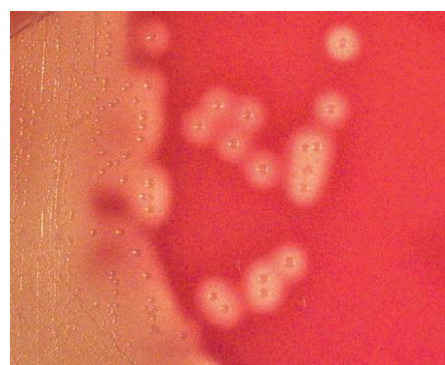


Figura 11: Meio COS com colónias de *Streptococcus pyogenes* onde se observa a β -hemólise [1]

pyogenes, embora outros *Streptococcus* do grupo A possam causar esta patologia. Estas amostras são semeadas em COS que é incubado a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂, sendo este meio imprescindível para se observar a β -hemólise característica desta bactéria (Figura 11). Aquando da sementeira no meio de cultura é adicionado um disco de bacitracina, antibiótico a qual esta bactéria é sempre sensível (S) [2], fornecendo-nos um diagnóstico presuntivo para este agente etiológico da faringite.

Os exsudados nasais têm como objetivo a pesquisa de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA), na sua grande maioria como parte de um painel de exames pré-operatórios. Esta bactéria pode provocar diversas patologias muitas delas graves como

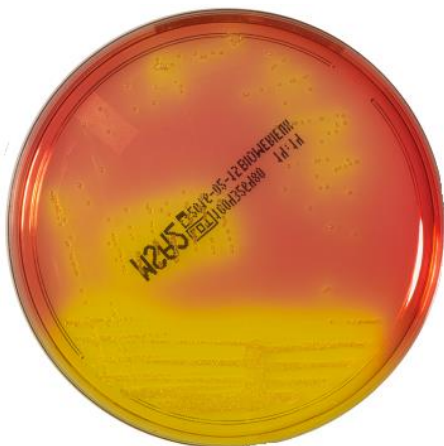


Figura 12: Meio MSA2 com colônias sugestivas de *S.aureus* (<http://www.biomerieux-culturemedia.com>)

pneumonia, meningite, síndrome do choque tóxico e septicemias, sendo considerada uma das principais bactérias nosocomiais [26]. O aumento de *S. aureus* resistentes a uma elevada gama de antibióticos faz com que seja imprescindível localizar hospedeiros (requisitos para a colonização ainda não são 100% conhecidos) e tentar erradicar a bactéria, uma vez que pessoas colonizadas têm maior probabilidade de desenvolver infecções provocadas por este microrganismo (e na sua maioria pela mesma estirpe com que estão colonizados) após procedimentos cirúrgicos, muitas das vezes com consequências graves apesar das terapias [26, 27].

Este tipo de produto é semeado em MSA2 e incubado a 37°C. Trata-se de um meio cromogéneo específico para *Staphylococcus spp.* permitindo ainda um diagnóstico presuntivo de *S. aureus* uma vez que as colônias destas bactérias adquirem a cor amarela (Figura 12) no meio devido à fermentação do manitol. Colônias suspeitas são identificadas e é feito o TSA para se confirmar se estamos ou não perante um MRSA. É de salientar que devido ao elevado microbiota associado a estes locais, a realização de uma coloração de Gram adquire pouca importância, não sendo efetuada neste tipo de produtos.

Agentes mais comuns: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Corynebacterium diphtheriae* [1].

3.4 Micobactérias

Todos os dias chegam ao laboratório amostras para pesquisa de micobactérias ou bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). Têm este nome uma vez que resistem à ação descolorante do álcool e do ácido, porque a sua parede tem elevado conteúdo lipídico (ácidos micólicos) que cria uma barreira hidrofóbica. Existem vários microrganismos pertencentes a este grupo sendo o mais estudado o *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose [1]. A inalação de apenas um bacilo viável pode levar ao desenvolvimento da

doença, razão pela qual estas amostras são processadas em câmaras de fluxo laminar para garantir a segurança dos manipuladores.

Nestas amostras é sempre feita uma coloração de Ziehl-Neelsen onde os BAAR adquirem uma coloração avermelhada. Em termos de análise cultural, a recuperação das micobactérias pode ser difícil uma vez que, sendo microrganismos de crescimento lento, a sua presença pode passar despercebida devido aos microrganismos de crescimento rápido existentes na amostra (provenientes do microbiota do trato respiratório) [1]. Para tentar combater este fenómeno, produtos não estéreis são liquefeitos/homogeneizados com N-acetil-cisteína, descontaminados com NaOH a 2% para eliminar bactérias contaminantes e ainda concentrados por centrifugação de modo a aumentar a percentagem de deteção das micobactérias caso estejam presentes na amostra [15]. A amostra é depois semeada em meio LJ e incubada a 37°C numa atmosfera capnófila. O crescimento destes microrganismos é lento, por isso os meios devem ser incubados 60 dias para se considerar a cultura negativa, sendo feitas observações semanais. As colónias de *M. tuberculosis* apresentam um aspeto característico semelhante a uma couve-flor (Figura 13).

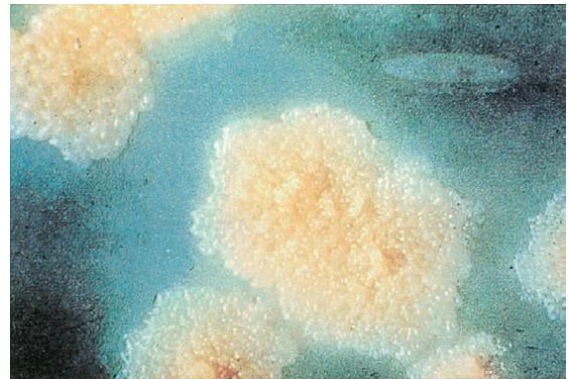


Figura 13: Meio LJ com colónias de *Mycobacterium tuberculosis* [1]

3.5 Testes de Identificação Bacteriana

Após obtermos colónias isoladas dos microrganismos suspeitos é necessário prosseguir com a sua identificação, tendo ao nosso dispor no laboratório equipamentos automatizados que nos ajudam nesta tarefa. São realizadas manualmente algumas provas bioquímicas, que nos orientam na escolha do painel/carta apropriado. Estas provas encontram-se sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6: Principais técnicas manuais para auxílio da identificação bacteriana [2]

Prova Bioquímica	Objetivo	Reação Positiva	Exemplos Microrganismos
Catalase	Deteção da enzima catalase; $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Libertação de gás (formação de bolhas)	(+): <i>Staphylococcus spp.</i> (-): <i>Streptococcus spp.</i>
Oxidase	Deteção da enzima citocromo oxidase; Uso de discos impregnados com tetramil-p-fenilenodiamina.	Disco adquire cor púrpura	(+): <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (-): Outros cocos Gram (-) (+): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-): <i>Enterobacteriaceae</i>
Coagulase	Deteção da enzima coagulase (capacidade de formar coágulos quando adicionado a plasma).	Formação de um coágulo	(+): <i>Staphylococcus aureus</i> (-): Outros <i>Staphylococcus spp.</i>
Resistência à Bacitracina	Efeito da bacitracina no microrganismo	Formação de halo de inibição >14mm	(+): <i>Streptococcus pyogenes</i> (-): Outros <i>Streptococcus spp.</i> β-hemolíticos
Resistência à Optoquina	Efeito da optoquina no microrganismo	Formação de halo de inibição >14mm	(+): <i>Streptococcus pneumoniae</i> (-): Outros <i>Streptococcus spp.</i> α-hemolíticos

3.6 Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

A principal intervenção clínica numa infeção bacteriana é o uso de antibióticos capazes de matar ou inibir a proliferação dos agentes patogénicos. O principal objetivo de um TSA é saber se determinado microrganismo é resistente/sensível à atividade de certos fármacos que podem ser potenciais escolhas para a terapia, tornando-se então componentes fundamentais dos relatórios microbiológicos e em conjunto com outros dados clínicos são usados para orientar o tratamento dos utentes [2].

As condições para a realização destes testes estão devidamente estandardizadas (concentração de inóculo, meio de cultura, condições e tempo de incubação, ...) de modo a manter a integridade dos fármacos e do crescimento microbiano e permitir ainda a reprodutibilidade dos resultados [1, 2]. Infelizmente esta estandardização não mimetiza as condições *in vivo*, estando o efeito de um fármaco num organismo sujeito a inúmeros fatores como a capacidade de difusão do antibiótico nos tecidos, a toxicidade do próprio fármaco e a sua interação com outros medicamentos, o estado de saúde e do sistema imunitário do doente, a virulência do microrganismo, a existência de outras patologias bem como a

severidade e o local da infecção. Tendo em conta todos estes elementos, alguns microrganismos sensíveis a uma antibioterapia *in vitro*, podem na realidade ser resistentes *in vivo* e o contrário também pode acontecer.

A existência de equipamentos automatizados como o VITEK 2 ou MICROSCAN WALKAWAY 96 PLUS permitem a realização de TSA automáticos onde é determinada a CMI de cada antibiótico e os resultados obtidos são posteriormente interpretados com base nas normas da EUCAST. Em certas situações em que os aparelhos não realizam os TSA (exemplo: *Haemophilus spp.*), recorre-se a métodos manuais como método de difusão em disco (método de Kirby-Bauer) onde se mede o impacto dos diferentes antibióticos no crescimento/viabilidade dos microrganismos [1].

Este método manual utiliza discos de papel de filtro impregnados com concentrações conhecidas de antibiótico e os antibióticos são selecionados de acordo com o microrganismo em estudo e as normas EUCAST. Estes discos são colocados num meio de cultura sólido, a gelose Mueller-Hinton (MHE), previamente inoculado com uma suspensão bacteriana com uma turbidez equivalente ao 0,5 McFarland, o que equivale a uma densidade microbiana de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, através da técnica de sementeira em toalha. Quando os discos são colocados no meio sólido, o antibiótico começa a difundir, estabelecendo um gradiente de concentração em redor do disco, e quanto mais próximo do disco, maior a concentração de antibiótico. As bactérias vão se multiplicar na gelose, exceto nos locais onde a concentração de fármaco é suficientemente elevada para inibir o seu crescimento. Após a incubação das placas (18-24h a 37°C), são medidos os diâmetros dos halos de inibição em redor dos discos em milímetros. Estas medições são posteriormente interpretadas, determinando a suscetibilidade ou resistência do microrganismo aos antibióticos testados com base no valor do diâmetro do halo [2].

A emergência de bactérias com multirresistências a diversos antibióticos é uma enorme preocupação para a saúde pública. O laboratório de microbiologia assume um papel fundamental na deteção e controlo das estirpes de bactérias com mecanismos de resistência às várias antibioterapias [28], sendo fulcral limitar o uso excessivo destes fármacos para diminuir as pressões seletivas que levam à criação destes mecanismos, para que, quando realmente seja preciso atuar, tenhamos fármacos eficazes para “salvar vidas”. Existem vários mecanismos de resistência que os aparelhos automáticos detetam nos seus painéis/cartas.

Um dos mecanismos mais comuns é a produção de ESBL por algumas bactérias (tendo o primeiro registo sido feito em 1983), enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, sendo inibidas pelo ácido clavulânico. As que mais

vulgarmente possuem este mecanismo são a *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli* que causam infecções do trato urinário, sendo já comuns no microbiota gastrointestinal de muitas pessoas, tendo a sua prevalência vindo a aumentar ao longo dos anos pensa-se que devido ao excesso de uso destes fármacos (quer em humanos e animais), à alimentação e às migrações populacionais. Este perfil de resistência exige que haja a presença de crescimento bacteriano em pelo menos uma de três cefalosporinas de 3ª geração, sendo confirmado manualmente através da técnica de difusão em disco (Figura 14), onde se verifica o sinergismo entre o ácido clavulânico e as cefalosporinas, ocorrendo o alargamento do halo de inibição (diminuição da CMI) [28-30].

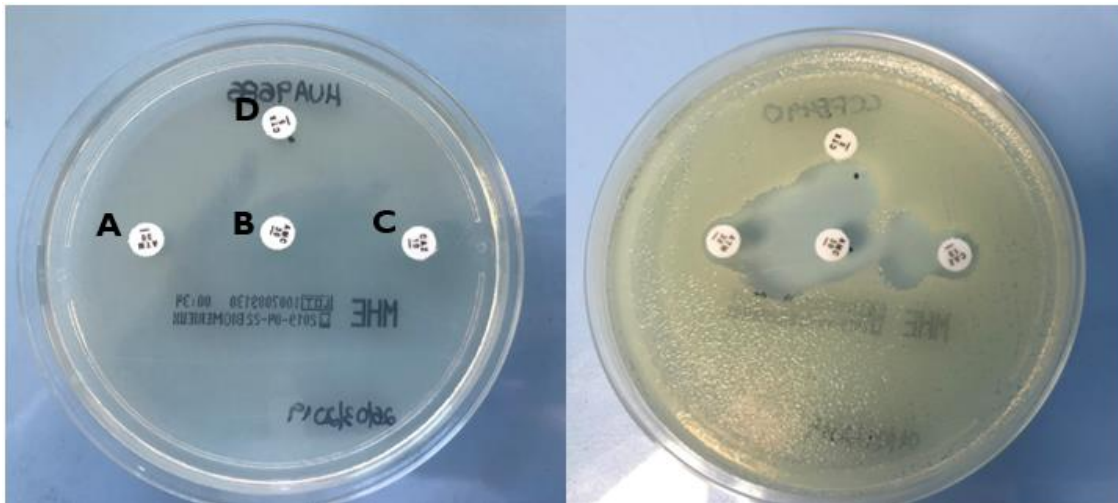


Figura 14: Método de difusão em disco para pesquisa de bactérias produtoras de ESBL. (A)- Aztreonam 30 μ g; (B)- Amoxicilina/Ácido clavulânico (2:1) 30 μ g; (C)- Cefotaxima 10 μ g; (D)- Cefotaxima 5 μ g. Observa-se o alargamento do halo de inibição devido ao sinergismo do ácido clavulânico com as cefalosporinas (Microbiologia do CMLGS)

3.7 Caso Clínico

Um utente do sexo masculino, com 64 anos e sem antecedentes pessoais relevantes foi submetido a uma intervenção cirúrgica e, conforme os protocolos hospitalares foi sujeito a antibioterapia profilática de modo a prevenir quaisquer infeções.

Ao quinto dia de internamento apresentou-se com um quadro de mau estar, febre (~38°C), fortes dores abdominais e uma severa diarreia aquosa. Foram feitas análises as quais revelaram leucocitose com neutrofilia e ainda um aumento da proteína C reativa.

Foram enviadas amostras fecais ao laboratório a partir das quais foi realizada uma coprocultura para pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* cujo resultado foi negativo. Através de testes imunocromatográficos foi feita a pesquisa de Adenovírus/Rotavírus e ainda a pesquisa de *Clostridium difficile* e das suas toxinas A e B, sendo este último ensaio positivo (Figura 15B).

Confirmada a suspeita de colite por *C. difficile* foi de imediato suspensa a antibioterapia administrada. Ao fim de quatro dias sem melhoras do quadro clínico foi iniciada a administração de metronidazol com a resolução dos sintomas 2 dias após o início do tratamento. Foi repetida a pesquisa da bactéria, cujo resultado foi negativo.

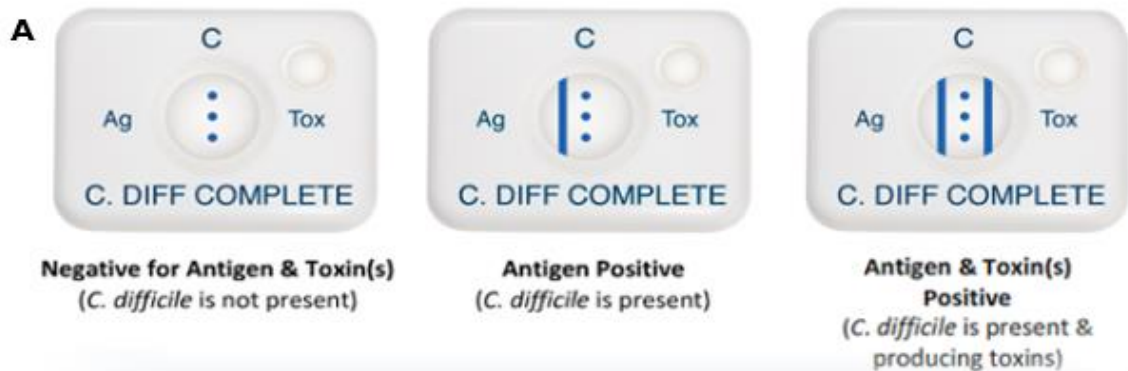


Figura 15: Teste imunocromatográfico para pesquisa de *Clostridium difficile*. **(A)**- Interpretação dos possíveis resultados; **(B)**- Resultado positivo do utente (Microbiologia CMLGS)



Discussão

Durante os internamentos hospitalares prolongados e após tratamentos com antibióticos, pode haver um desequilíbrio do microbiota gastrointestinal [21] e um aumento da proliferação de microrganismos oportunistas, como é o caso de *Clostridium difficile*. É um bacilo Gram positivo anaeróbio e produtor de esporos, e as infeções por ele causadas têm aumentado de intensidade e severidade. Esta bactéria causa distúrbios intestinais, que vão desde leves diarreias a colites pseudomembranosas [19, 21].

As toxinas A e B são responsáveis pelos sinais clínicos. Estas toxinas ligam-se à superfície das células epiteliais do intestino, levando à sua morte, danificando assim a mucosa intestinal. Para além disso, estas toxinas têm ainda um efeito inflamatório, uma vez que possuem a capacidade de atraírem leucócitos para o local [19, 21].

Uma vez que na maioria dos casos estas infeções ocorrem após a terapêutica com antibióticos, deve-se apenas suspender a antibioterapia e deixar o microbiota se “restaurar”. Se não houver melhorias ou ainda agravamento do quadro clínico, pode-se recorrer a fármacos como o metronidazol ou a vancomicina [19, 21].

4. Imunologia

O conceito de imunidade é definido como o estado de resistência à doença [31], sendo a imunologia o estudo das defesas do nosso organismo contra agentes infecciosos [32]. A resposta do sistema imunitário contra substâncias que reconhece como estranhas permite a nossa proteção contra agentes patogénicos, tendo ainda um papel fulcral na eliminação de células tumorais e células ou anticorpos com afinidade para o próprio. Qualquer molécula com capacidade de ser reconhecida por este sistema é designada de antigénio (Ag) [33].

Este sistema possui vários componentes e, como primeira linha os agentes invasores encontram barreiras físicas e químicas como a pele, mucosas, secreções (urina, suor, entre outros) e ainda células ciliadas. A rutura destas barreiras anatómicas pode desencadear dois tipos de resposta, a inata ou a adquirida.



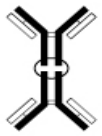


Na imunidade inata há uma resposta imediata ao invasor, tratando-se de uma defesa pré-existente e não específica, sendo semelhante para todos os tipos de antigénios. Deste mecanismo fazem parte os fagócitos, células *Natural Killer* (NK) e ainda o sistema do complemento que controlam a disseminação de agentes patogénicos nos locais mais comuns de entrada, destruindo agentes invasores, células infetadas por vírus e algumas células tumorais. Para além disso os leucócitos libertam mediadores inflamatórios que vão desencadear o início da resposta por parte da última e mais eficaz linha de defesa, a imunidade adquirida. Esta, apesar de levar mais tempo a se desenvolver é muito mais eficiente, uma vez que faz um reconhecimento específico de cada antigénio e cria uma “memória imunológica”, ou seja, aquando de um segundo contacto com o mesmo agente, a resposta despoletada vai ser muito mais rápida e intensa. Esta resposta pode ser mediada por células, essencialmente linfócitos T, onde os linfócitos T citotóxicos destroem células infetadas e os linfócitos T auxiliares coordenam as respostas imunes, havendo também uma resposta humoral, onde linfócitos B se diferenciam em plasmócitos e iniciam a produção de anticorpos específicos [1, 33].

O sucesso do sistema imunitário depende da ativação, regulação e resolução da resposta por ele desencadeada. Este só deve ser ativado quando um antigénio estranho ao organismo é reconhecido por anticorpos circulantes ou por recetores de superfície celular, sendo posteriormente o complexo antigénio-anticorpo fagocitado e destruído. Esta resposta tem de ser regulada, de modo a não causar danos ao hospedeiro, sendo fulcral nesta fase o papel dos linfócitos T reguladores que secretam citocinas imunossupressoras. Por fim, quando a ameaça é neutralizada, o sistema imunitário deixa de ser estimulado, havendo um término da resposta com a apoptose dos componentes envolvidos. O sistema imunitário pode sofrer

algum tipo de desequilíbrio que se manifesta como uma imunodeficiência, reações de hipersensibilidade e ainda as doenças autoimunes.

Os anticorpos/imunoglobulinas são glicoproteínas que apresentam uma região variável que confere especificidade para o antígeno e uma região constante com propriedades efetoras. São constituídos por duas cadeias leves e duas pesadas unidas por ligações dissulfídicas, correspondendo a cerca de 20% das proteínas plasmáticas. As diferentes classes de imunoglobulinas (Ig) baseiam-se nas diferenças das sequências de aminoácidos que formam as regiões constantes (Tabela 7) [15, 34].

Tabela 7: Classificação e características das principais classes de imunoglobulinas [15]

Imunoglobulina		Características
IgM		Associam-se em pentâmeros, o que faz com que cada anticorpo tenha 10 locais para ligação de antígenos; Predominantes na resposta primária; Menor afinidade para os antígenos.
IgG		Forma monomérica, sendo a imunoglobulina de menor tamanho (sai facilmente dos vasos e penetra nos tecidos); Envolvidas na resposta secundária, sendo produzidas em maiores quantidades e tendo maior durabilidade no soro; Maior afinidade para os antígenos; Única classe de imunoglobulina que consegue atravessar a placenta, conferindo imunidade ao feto.
IgA		Forma dimérica ou trimérica; Presente nas secreções (saliva, leite e fluídos intestinais); Importante na defesa contra parasitas; Única imunoglobulina que consegue atuar dentro de células.
IgE		Forma monomérica; Presente nas secreções; Importante na defesa contra parasitas; Capacidade de se ligar a receptores em basófilos e mastócitos, induzindo a sua desgranulação (libertação de histamina); Envolvido nas reações alérgicas.
IgD		Forma monomérica; Forma membranácea em linfócitos B maduros (diminutas concentrações no soro); Ainda não se conhece na totalidade as suas funções.

Apesar dos inúmeros avanços na área da microbiologia, em muitas infecções quer elas sejam bacterianas, parasitárias ou virais, é extremamente difícil recuperar e isolar o microrganismo responsável, por isso as técnicas de diagnóstico serológico, no qual se deteta antígenos ou anticorpos no sangue periférico têm um papel fundamental no diagnóstico de

várias infeções. Com estas técnicas conseguimos detetar a existência de infeção e, através da quantificação das diferentes classes de anticorpos podemos avaliar se esta se encontra numa fase aguda, crónica ou se já está em fase de resolução.

4.1 Equipamentos Automatizados

O setor de imunologia, tal como todas as outras áreas, é composto por vários equipamentos automatizados de forma a otimizar os tempos de resposta e diminuir a fração de erros humanos. Fazem parte desta área três equipamentos: o LIAISON e dois ADVIA CENTAUR XP (Immunoassay system) que realizam inúmeros ensaios como estudos de fertilidade, endocrinologia, marcadores tumorais, serologia infecciosa entre outros, devidamente enumerados na Tabela 8.

Apesar dos equipamentos usados serem de diferentes casas comerciais, todas as determinações são sustentadas por imunoensaios, ou seja, baseiam-se na deteção de um complexo antigénio-anticorpo, variando apenas o método de deteção do mesmo. Os equipamentos presentes no laboratório utilizam a quimioluminescência para detetar a formação destes imunocomplexos [33].

A quimioluminescência pode ser definida como a emissão de energia na forma de luz a partir de uma reação química (normalmente a oxidação de um composto orgânico), ou seja, através da formação de um intermediário químico excitado que se decompõe e liberta parte da sua energia como fotões de luz [35]. Quando esta tecnologia é combinada com um imunoensaio, a luz emitida permite calcular a concentração do analito em estudo, onde a molécula quimioluminescente é utilizada para detetar e quantificar a reação [36,37].

O ADVIA CENTAUR XP utiliza o éster de acridina (EA) como marcador quimioluminescente [38]. Esta molécula ao ser oxidada pelo peróxido de hidrogénio vai emitir luz, atingindo o pico de emissão em cerca de 1 segundo. O equipamento maximiza a emissão de luz ao mudar o pH do meio de reação de ácido para básico. Nesta metodologia são ainda usadas partículas paramagnéticas (PMP) com anticorpos/antigénios aderidos que aumentam a superfície de reação em cerca de 50x quando comparadas com outros métodos. Estas partículas ligam-se ao antigénio/anticorpo em estudo presente na amostra e, quando o sistema expõe a cuvete de reação a um campo magnético, atrai as PMP com imunocomplexos Ag-Ac que ficam aderidos na parede da cuvete, havendo uma lavagem que elimina o reagente em excesso e todos os outros compostos que não se ligaram às PMP.

O LIAISON apresenta uma metodologia semelhante ao equipamento anteriormente descrito, sendo a única diferença o facto de utilizar como marcador um derivado do isoluminol em vez do EA.

Relativamente ao formato de deteção do analito em estudo, estes equipamentos utilizam três princípios distintos: imunoensaio competitivo, não competitivo (do tipo *sandwich*) e imunoensaio de captura de anticorpo.

Tabela 8: Ensaios realizados nos equipamentos LIAISON e ADVIA CENTAUR XP

Área de Estudo	Analito	Equipamento
Tiróide	TSH ¹ , T3 ² , T4 ³ , FT3 ⁴ e FT4 ⁵	ADVIA CENTAUR XP
Marcadores Tumorais	CA 19.9 ⁶ , CA 15.3, CA125, CEA ⁷ , PSA ⁸ , fPSA ⁹ e AFP ¹⁰	ADVIA CENTAUR XP
Hormonas	FSH ¹¹ , LH ¹² , testosterona, progesterona, prolactina, insulina, estradiol, PTH ¹³ e β -hCG ¹⁴	ADVIA CENTAUR XP
Citomegalovírus (CMV)	IgM e IgG	LIAISON
Rubéola	IgM e IgG	
Toxoplasmose	IgM e IgG	
Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)	Ac Anti VIH1/2	ADVIA CENTAUR XP
Vírus da Hepatite A (VHA)	Ac Anti-VHA IgM	ADVIA CENTAUR XP
	Ac Anti-VHA Total	
Vírus da Hepatite C (VHC)	Ac Anti-VHC	ADVIA CENTAUR XP
Vírus da Hepatite B (VHB)	Ag HBs	ADVIA CENTAUR XP
	Ac Anti-HBs	
	Ac Anti-HBc IgM	
	Ac Anti-HBc Total	
Vitaminas	Vitamina D	LIAISON
	Vitamina B12 e Ácido Fólico	ADVIA CENTAUR XP
Outros	Ferritina	ADVIA CENTAUR XP

1-Tiroestimulina; 2-Tri-iodotironina; 3-Tiroxina; 4-Tri-iodotironina livre; 5-Tiroxina livre; 6-Antigénio Carbohidratado; 7-Antigénio Carcinoembrionário; 8-Antigénio Específico da Próstata; 9-Antigénio Específico da Próstata livre; 10- α -fetoproteína; 11-Hormona Folicúlo-Estimulante; 12-Hormona Luteinizante; 13-Hormona Paratiroideia; 14-Gonadotrofina Coriónica Humana.

4.1.1 Imunoensaio Competitivo

Neste tipo de imunoensaio são adicionados à amostra antígenios ou anticorpos marcados com EA e PMP revestidas com anticorpos ou antígenios, respetivamente. Os antígenios marcados com EA competem com os que existem no soro por locais de ligação aos anticorpos adsorvidos à superfície da fase sólida (PMP). Quanto maior a concentração do antígeno na amostra, menos antígenios marcados se ligam. Após exposição a um campo magnético e uma lavagem, permanecem na cuvete PMP revestidas por anticorpos ligadas aos antígenios presentes na amostra e outras ligadas aos antígenios marcados (Figura 16).

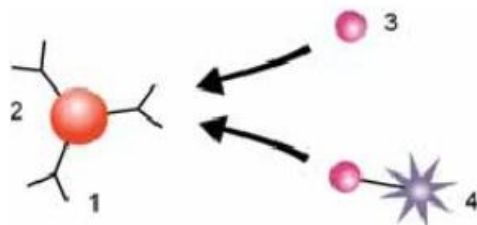


Figura 16: Imunoensaio Competitivo com antígeno marcado com EA. 1- Anticorpo; 2- PMP; 3- Ag da amostra; 4- Ag marcado com EA (<https://pt.scribd.com/doc/313324484/ADVIA-Centaur-XP-Reference-Manual>)

Quando são anticorpos que estão marcados, os antígenios aderidos às PMP competem com o antígeno da amostra por locais de ligação aos anticorpos marcados. Quanto maior a concentração do analito na amostra, menos PMP se ligam aos anticorpos marcados. Após exposição a campo magnético e lavagem, ficam presentes na cuvete apenas as PMP revestidas com antígenios ligadas aos anticorpos marcados (Figura 17).

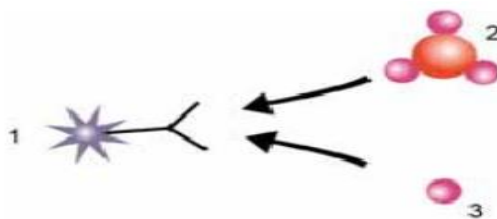


Figura 17: Imunoensaio Competitivo com anticorpo marcado com EA. 1- Anticorpo marcado com EA; 2- PMP revestida com antígenios; 3- Ag da amostra (<https://pt.scribd.com/doc/313324484/ADVIA-Centaur-XP-Reference-Manual>)

Em ambas as reações o equipamento faz uma medição da luz emitida em unidades relativas de luz (RLUs), onde a concentração de analito é inversamente proporcional à emissão de luz, ou seja, quanto menor a concentração do Ag/Ac em estudo na amostra, maior quantidade de luz vai ser emitida.

4.1.2 Imunoensaio Não Competitivo (do tipo *sandwich*)

Nos imunoensaios do tipo *sandwich* o reagente adicionado à amostra contém anticorpos marcados com EA. Estes anticorpos vão-se ligar ao antígeno em estudo, caso este esteja presente, sendo de seguida adicionadas PMP revestidas com anticorpos que vão reconhecer o mesmo antígeno, mas num epítopo distinto. Forma-se então um complexo constituído por: PMP revestida com Ac - Ag da amostra - Ac marcado com EA. A exposição da cuvete de reação a um campo magnético arrasta estes complexos para a parede da cuvete e, após lavagem, ficam apenas presentes os imunocomplexos que contém o analito em estudo (Figura 18).

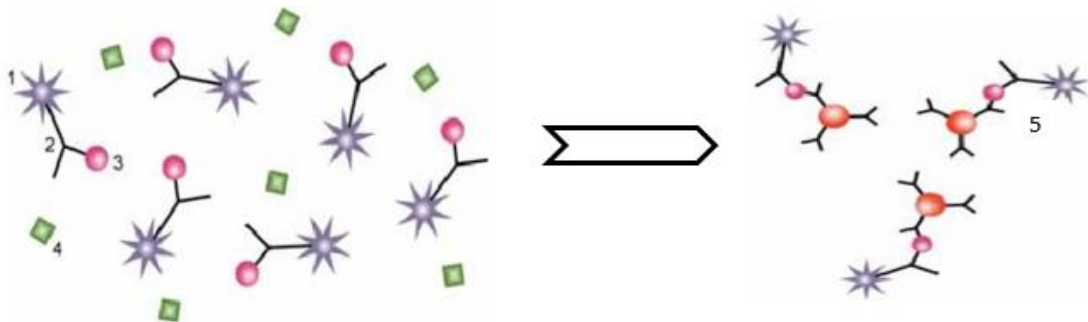


Figura 18: Imunoensaio não competitivo. 1- EA; 2- Ac; 3- Ag da amostra; 4- Outros Ag; 5- Complexo PPM - Ac - Ag da amostra - Ac marcado com EA (<https://pt.scribd.com/doc/313324484/ADVIA-Centaur-XP-Reference-Manual>)

O equipamento vai então medir a emissão de luz em RLUs, e quanto maior a quantidade de antígeno presente na amostra, mais luz é emitida, ou seja, a relação entre a concentração de analito e a emissão de luz é de proporcionalidade direta.

4.1.3 Imunoensaio de Captura de anticorpo

Quando o analito a ser medido é um anticorpo, é usada esta metodologia. Em primeiro lugar são adicionadas PMP revestidas com anticorpos que se vão ligar ao anticorpo em estudo, caso este se encontre na amostra. Em seguida a cuvete é exposta a um campo magnético e sujeita a uma lavagem para retirar o excesso de reagente e tudo o que não se ligou às PMP. Numa segunda fase são adicionados antígenos marcados com EA que se ligam ao anticorpo da amostra, havendo uma nova exposição a um campo magnético e uma segunda lavagem, ficando presente na cuvete o complexo do antígeno marcado com EA, ligado ao anticorpo do soro que se encontra também ligado ao anticorpo presente na superfície da PMP (Figura 19).

Por último, e tal como em todos os outros imunoensaios anteriormente descritos, é feita uma medição da luz emitida em RLUs, havendo uma relação de proporcionalidade direta entre a quantidade de anticorpo presente e a emissão de luz.

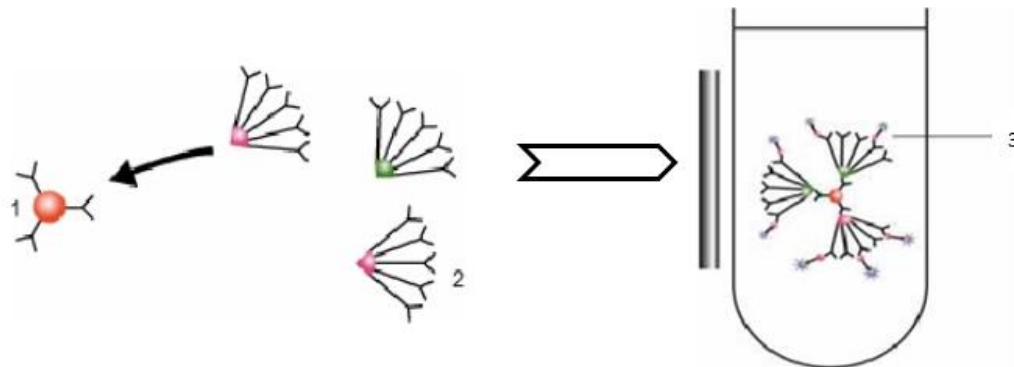


Figura 19: Imunoensaio por captura de anticorpo. 1- Ac ligado a PMP; 2- Ac da amostra; 3- Ag marcado com EA (<https://pt.scribd.com/doc/313324484/ADVIA-Centaur-XP-Reference-Manual>)

4.2 Marcadores Tumorais

O cancro é das principais causas de morte nos países desenvolvidos, sendo um problema com grande impacto na saúde pública. Os marcadores tumorais são substâncias produzidas pelas células neoplásicas ou pelo hospedeiro em resposta ao tumor, sendo possível a sua deteção no tumor, sangue e outros fluidos corporais [35]. A pesquisa destes marcadores tem uma elevada importância no acompanhamento da evolução clínica de doentes oncológicos.

Infelizmente a grande maioria destes marcadores não é específica de um tumor em particular, podendo a sua concentração estar aumentada em vários tipos de tumor e ainda em patologias não neoplásicas. Ficando aquém das expectativas, estes marcadores são muito pouco sensíveis e específicos, não podendo ser usados isoladamente para diagnosticar um cancro. Atualmente são úteis na avaliação da eficácia da terapia, da progressão da doença após tratamento inicial e ainda na deteção precoce de recidivas e metástases [35, 39].

4.2.1 Antígeno Carbohidratado 19-9

O antígeno carbohidratado 19-9 (CA 19-9) é uma glicoproteína de elevado peso molecular. É um marcador de neoplasias gastrointestinais, com especial importância no cancro do pâncreas, embora valores normais não afastem esse diagnóstico [39, 40]. Em condições normais esta glicoproteína é sintetizada pelo pâncreas, ductos biliares, estômago, cólon, endométrio e ainda o epitélio salivar [35]. Os valores séricos normalmente não têm grande relação com a massa tumoral, sendo útil na monitorização e prognóstico da doença após

tratamento, permitindo detetar recidivas e metástases mesmo antes de serem detetáveis em exames imagiológicos [39, 40].

Este marcador pode estar elevado também no cancro hepatocelular, do estômago, colo-retal e ainda em patologias benignas como estase biliar, cirrose e pancreatite.

4.2.2 Antígeno Carbohidratado 125

O antígeno carbohidratado 125 (CA 125) é uma glicoproteína de elevado peso molecular normalmente expressa pelo endométrio durante o desenvolvimento fetal. É considerado o melhor marcador para avaliação da eficácia terapêutica e da progressão do carcinoma do ovário, sobretudo o adenocarcinoma seroso, uma vez que cerca de 80% de mulheres com este tipo de tumor apresentam elevação dos níveis do CA 125 na corrente sanguínea, sendo também útil na deteção de recidivas da doença.

Este marcador pode também estar elevado noutros tipos de cancro como o do pulmão, do útero (endométrio), rim, estômago e linfoma não-Hodgkin. Alguns processos não malignos como gravidez, endometriose e menstruação podem causar aumento da concentração deste marcador. O público alvo para rastreios são as mulheres pós-menopausa, onde o CA 125 é um adjuvante na avaliação do risco de malignidade de massas pélvicas palpáveis em mulheres deste grupo em conjunto com a realização de ecografias [39, 41].

4.2.3 Antígeno Carbohidratado 15-3

O antígeno carbohidratado 15-3 (CA 15-3) é uma glicoproteína produzida em resposta ao carcinoma da mama. Este cancro é o mais comum no sexo feminino a nível mundial e que apresenta maior taxa de mortalidade, estando o número de casos a aumentar todos os anos [35, 42]. É um marcador com baixa sensibilidade, principalmente na deteção da doença em fases iniciais. É utilizado na monitorização da terapêutica em doentes com neoplasias da mama, uma vez que uma elevação dos seus valores na corrente sanguínea pode indicar falha terapêutica e a existência de metástases, logo, um pior prognóstico [42].

A sua concentração pode estar aumentada em outras patologias como o cancro do estômago, do ovário, da próstata, do pulmão e ainda em condições benignas como estase biliar, hepatite, hipotireoidismo e anemia megaloblástica.

4.2.4 α -fetoproteína

A α -fetoproteína (AFP) faz parte do grupo dos antígenos oncofetais, ou seja, proteínas produzidas pelo feto cujos níveis diminuem drasticamente após o nascimento, podendo aumentar em alguns tipos de neoplasias [35]. A AFP é a principal glicoproteína plasmática fetal, sendo produzida pelo saco vitelino e pelo fígado fetal, diminuindo a sua concentração para níveis indetetáveis após o nascimento.

Em 1963 estabeleceu-se uma associação entre o aumento dos níveis séricos deste marcador com o carcinoma hepatocelular, verificando-se que, em mais de 80% dos casos diagnosticados, esta glicoproteína é detetada no soro dos doentes, aumentando muitas vezes antes de o tumor ser detetável em exames imagiológicos. Na maioria das vezes a concentração relaciona-se com o tamanho do tumor, sendo usado para monitorizar a resposta à terapêutica, sempre com o auxílio de técnicas imagiológicas.

Como todos os outros marcadores já referenciados, apresenta baixa especificidade, podendo aumentar as suas concentrações na corrente sanguínea em outras doenças como cancro do trato gastrointestinal, cancro do testículo, metástases hepatocelulares de outras neoplasias, doenças crónicas do fígado (cirrose e hepatite) e ainda na gravidez. Atualmente é também usado como método adjuvante das ecografias no rastreio deste carcinoma em utentes com cirrose não alcoólica [39, 43].

4.2.5 Antígeno Carcinoembrionário

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína oncofetal normalmente expressa nas células da mucosa do epitélio gastrointestinal, havendo um aumento da sua produção em adenocarcinomas, especialmente no colo-retal [44]. Trata-se de uma molécula de adesão e pensa-se que o aumento da sua concentração leva a uma perda da arquitetura celular, uma das características dos tumores malignos.

Os níveis séricos deste marcador normalmente apresentam uma boa correlação com a massa tumoral inicial, sendo útil no estadiamento da doença. Para além disso são fulcrais na monitorização do tratamento e na evolução clínica dos doentes, verificando-se que aumentos bruscos na concentração deste analito após terapia normalmente significa recorrência da doença ou metastização [35, 39, 44].

Este marcador não é específico deste tipo de tumor, podendo também apresentar valores elevados na corrente sanguínea no carcinoma do estômago, pulmão, da mama e ainda em outras condições não neoplásicas como úlceras pépticas, doença inflamatória do intestino, pancreatite, hipotireoidismo e cirrose.

4.2.6 Antígeno Específico da Próstata

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína produzida exclusivamente pela próstata, sendo segregada para o lúmen prostático. É uma enzima que tem uma função fluidificante do líquido seminal. Está intimamente relacionada com o cancro da próstata embora valores séricos normais não permitam excluir este diagnóstico [35, 45, 46].

É um marcador específico da próstata, mas não do cancro prostático, não sendo por si só suficiente para o rastreio/diagnóstico deste tipo de neoplasia, mas tem vindo a ser usado em conjunto com o exame retal digital (DRE) para o rastreio desta doença [35, 39]. Quanto mais alto o valor de PSA, maior a possibilidade de existir um adenocarcinoma, havendo estudos que correlacionam os níveis séricos deste marcador com o tamanho do tumor e o prognóstico clínico dos doentes. O seu principal papel é na avaliação da eficácia terapêutica, permitindo detetar precocemente recidivas ou metástases. A sua concentração na corrente sanguínea também pode aumentar em outras patologias como a hipertrofia benigna da próstata, prostatite, trauma prostático, após ejaculação e ainda no carcinoma da mama [45].

O PSA circula na corrente sanguínea complexado com proteínas inibidoras das proteases, a α 1-antitripsina (ACT) e a α 2-macroglobulina (AMG), contudo uma componente menor permanece livre no soro. A razão PSA total/PSA livre permite discriminar aumentos deste marcador devidos a uma hipertrofia benigna ou devido a um carcinoma, verificando-se que quanto menor a percentagem da fração livre na corrente sanguínea, maior é o risco de este aumento de PSA se dever a uma neoplasia [46].

4.3 Vírus da Imunodeficiência Humana

O VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana) é um vírus pertencente à família *Retroviridae*, envelopado, com um genoma de RNA e tem como único hospedeiro a espécie humana. O VIH (Figura 20) teve origem em vírus provenientes de primatas, sendo o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A doença foi descrita pela primeira vez em 1981, e o VIH foi isolado mais tarde, em 1983. Pensa-se que as primeiras infeções terão ocorrido em África, e as migrações espalharam o vírus para centros populacionais, disseminando-o pelo mundo. A infeção por VIH representa um dos principais problemas de saúde pública, estimando-se que estejam infetadas atualmente cerca 37 milhões de pessoas. Existem dois tipos conhecidos do vírus, o VIH-1 e o VIH-2, diferenciados com base na organização do seu genoma, apresentando uma homologia de cerca de 50%. As partículas virais estão presentes em elevado número no sangue, sémen e secreções vaginais e são transmitidas principalmente através de relações sexuais sem proteção, transfusões

sanguíneas, cortes/picadas com objetos contaminados e ainda por transmissão vertical (durante a gravidez, parto ou aleitamento). Um indivíduo infetado sem qualquer tipo de terapia antiviral, em cerca de 10 anos irá desenvolver infecções oportunistas fatais em consequência da imunossupressão provocada pelo vírus [1, 15, 33].

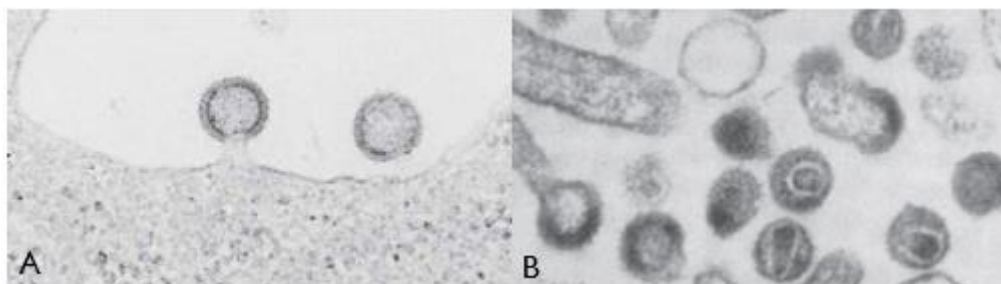


Figura 20: Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). **(A)**- Dois vírus prestes a serem libertados da superfície celular de um linfócito; **(B)**- Estrutura da partícula viral. [1, 15]

Este vírus tem tropismo para células que expressem o recetor CD4, nomeadamente linfócitos T auxiliares, macrófagos, células dendríticas, entre outros. Glicoproteínas existentes no envelope viral ligam-se ao recetor CD4 e de seguida a um coreceptor (CCR5 ou CXCR4), permitindo a fusão do envelope com a membrana da célula. Aquando da libertação do genoma viral no citoplasma, a transcriptase reversa sintetiza uma dupla cadeia de DNA a partir do RNA viral. Esta enzima tem uma elevada percentagem de erros, cerca de 1 erro por cada 2000 bases, ou seja, aproximadamente 5 erros por cada genoma. Esta característica associada às elevadas taxas de replicação faz com que o VIH sofra mutações diárias, especialmente a nível do gene que codifica o envelope, sendo por isso encontradas populações heterogêneas de vírus num único indivíduo infetado, podendo alterar a sua patogenicidade, facilitando o seu escape ao sistema imunitário e criando ainda mais dificuldade na criação de uma vacina. Para além de integrar o seu genoma no da célula infetada, o VIH tem ainda a capacidade de ficar num estado de latência em células inativas, células de memória, que têm uma estabilidade a longo prazo, iniciando a produção de mais partículas virais aquando de um estímulo que induza a ativação dessas mesmas células. Estas células encontram-se essencialmente nos nódulos linfáticos e são um autêntico reservatório latente do VIH [1, 15, 33].

Após o contato inicial com o vírus existe uma fase aguda que dura entre 2 a 6 semanas, havendo elevadas taxas de replicação viral, existindo partículas virais disseminadas por todo o organismo, sendo uma fase com elevado perigo de contágio. Há uma queda significativa do número de linfócitos T CD4 circulantes. A resposta imune produzida promove um quadro de sintomas semelhante a uma gripe ou à mononucleose aguda. Esta resposta faz com que linfócitos T citotóxicos eliminem muitas células infetadas e sejam criados anticorpos contra o vírus, limitando a produção de novas partículas virais, diminuindo a carga viral na corrente

sanguínea e aumentando o número de linfócitos, entrando o indivíduo na fase de latência. Nesta fase não há manifestações clínicas inerentes à atividade do vírus, havendo apenas discretas linfadenopatias. Houve uma anterior disseminação do VIH para os nódulos linfáticos, onde podem persistir até 10 anos. É uma fase de latência clínica, mas não viral, havendo elevadas taxas de replicação do VIH e uma perda gradual de linfócitos T CD4. A morte destas células resulta da citólise induzida pelo vírus, da atividade de linfócitos T citotóxicos e ainda de uma forma de “suicídio inflamatório” cometido por células infectadas, processo designado de piroptose. Este último mecanismo de morte alerta o sistema imunitário de que algo está errado, atraindo mais linfócitos para o local, que por sua vez também vão ser infectados pelas partículas virais libertadas e também estes vão entrar em piroptose. A duração desta fase é variável, dependendo da relação entre a carga viral e as contagens de linfócitos T CD4, podendo a quantificação da carga viral e do número de linfócitos T CD4 na fase de latência ser um indicador de prognóstico, prevendo o risco de progressão rápida da doença e fracas respostas aos tratamentos.

Quando o número de linfócitos T CD4 diminui abaixo de certo nível, o indivíduo entra na fase de SIDA, caracterizada por um estado de profunda imunossupressão. Isto deve-se à destruição dos linfócitos, que desempenham um papel fundamental na ativação e regulação das respostas imunes. Não conseguindo o sistema imunitário manter a atividade antiviral, os níveis de VIH na corrente sanguínea aumentam drasticamente e o estado de imunodeficiência torna o indivíduo extremamente suscetível a infeções oportunistas e neoplasias incomuns como o sarcoma de Kaposi. Para além disto, o VIH pode ainda causar alterações neurológicas, levando a quadros de demência [1, 15, 33].

Para dizermos que um indivíduo se encontra na fase de SIDA é necessária a presença de anticorpos anti-VIH no seu plasma, contagem de linfócitos T CD4 inferior a 200 linfócitos/ μ L de sangue e a presença de infeções oportunistas. O curso normal de uma infeção pelo VIH encontra-se esquematizado na Figura 21.

A infeção adquirida por via vertical é mais agressiva, havendo uma progressão rápida da doença. Os sintomas tendem a manifestar-se por volta dos 2 anos de idade, ocorrendo a morte da criança num espaço de dois anos. Pensa-se que os lactentes são muito suscetíveis aos efeitos devastadores do VIH no sistema imunitário uma vez que, aquando da infeção, este não se encontra totalmente formado, não conseguindo controlar a replicação do vírus [1, 33].

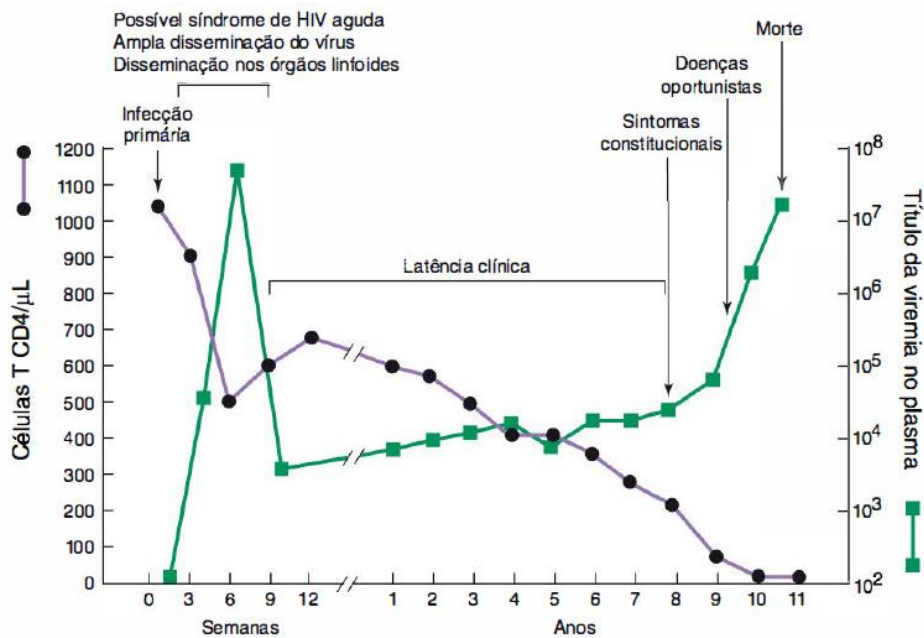


Figura 21: Evolução normal de uma infecção pelo VIH sem tratamento [15]

No laboratório é feita a pesquisa de anticorpos contra o VIH-1/2. Quando o ensaio apresenta um resultado de reativo (presença de anticorpos contra o VIH-1 ou 2), o teste é repetido em duplicado e consoante os resultados esquematizados na Figura 22, é feito um pedido ao laboratório central para a realização de um teste confirmatório por *immunoblot*, onde se identifica se o VIH presente é do tipo 1 ou 2 [47].

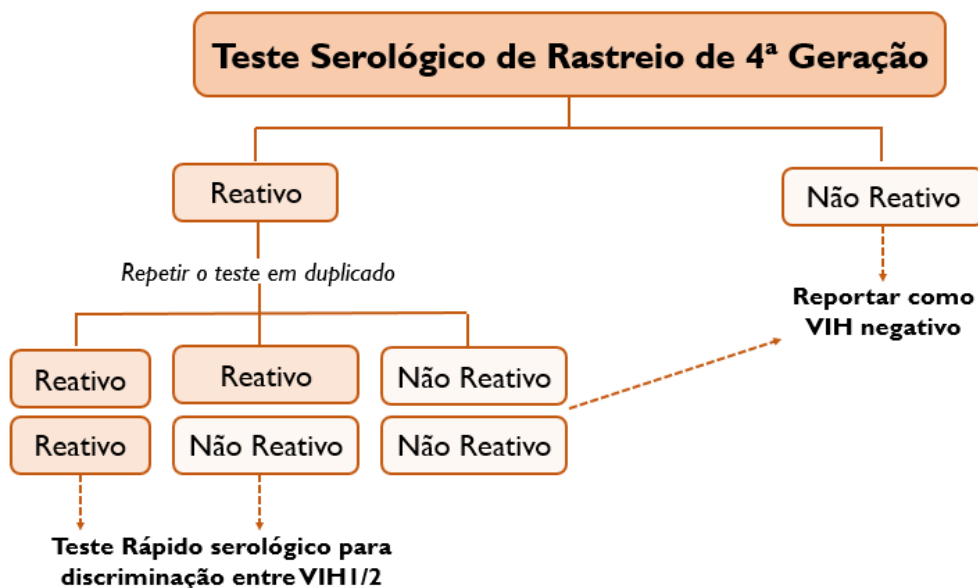


Figura 22: Normas indicativas para o diagnóstico laboratorial de uma infecção por VIH [47]

4.4 Hepatites Virais

A hepatite é uma inflamação do fígado que pode ter inúmeras causas, sendo as mais comuns as hepatites virais. Aquando destas infeções, o fígado não consegue desempenhar as suas principais funções devido às lesões causadas como a necrose dos hepatócitos [15]. Na grande maioria dos casos, este órgão consegue regenerar (entre 8-12 semanas) e recuperar todas as suas capacidades funcionais após resolução da infeção, mas em casos mais severos pode haver uma evolução para cirrose ou até para um carcinoma hepatocelular, um dos tumores mais comuns e associado a elevadas taxas de mortalidade. As hepatites podem ser provocadas por bactérias, vírus, consumo de álcool, fármacos ou outras substâncias tóxicas, existindo ainda hepatites autoimunes.

Em muitos casos estas infeções são assintomáticas e, no caso das hepatites virais, os indivíduos são contagiosos mesmo antes do aparecimento dos primeiros sintomas, daí a sua facilidade de disseminação pela população. Os sintomas mais comuns são fadiga, náuseas, vómitos, febre, dores abdominais, icterícia, urina escura (bilirrubinúria) e fezes pálidas. Laboratorialmente verifica-se um aumento dos valores séricos das enzimas hepáticas [1, 15].

As hepatites mais comuns são as virais, existindo 5 tipos de vírus responsáveis por esta patologia: o Vírus da Hepatite A (VHA), B (VHB), C (VHC), D (VHD) e E (VHE). Apesar do órgão alvo de todos estes vírus ser o fígado e de os sintomas por eles provocados serem semelhantes, eles diferem entre si na sua estrutura, modo de replicação e transmissão, diferindo também entre eles a evolução clínica da doença [1]. Na Tabela 9 estão descritas as principais características destes vírus, no entanto irei aprofundar com maior detalhe neste relatório o VHA, VHB e VHC, uma vez que são os agentes com maior significado clínico e os que são diagnosticados laboratorialmente no CMLGS.

Tabela 9: Principais características dos vírus da hepatite [1]

	VHA	VHB	VHC	VHD	VHE
Família	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	Não classificado	<i>Hepeviridae</i>
Genoma	ssRNA (+)	dsDNA	ssRNA (+)	ssRNA (-)	ssRNA (+)
Meio de transmissão	Fecal-oral	Parenteral	Parenteral	Parenteral	Fecal-oral
Período de Incubação (dias)	15-50	45-160	14-180	15-64	15-50
Mortalidade	<0,5%	1-2%	4%	Alta (no caso de coinfeção com o VHB)	1-2% (Paciente normal) 20% (Mulher grávida)
Doença Crônica	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Associação a outras patologias	-	Cirrose, Carcinoma Hepatocelular	Cirrose, Carcinoma Hepatocelular	Cirrose, Hepatite fulminante	-

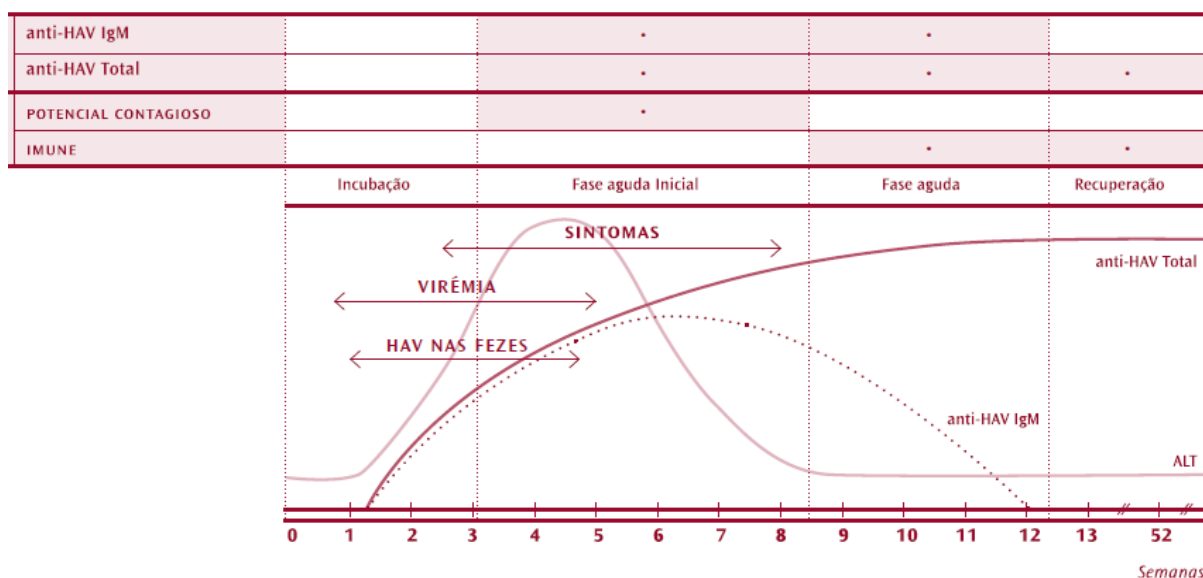
4.4.1 Hepatite A

O VHA é um pequeno vírus esférico, sem envelope, possui um genoma de RNA de cadeia simples, de polaridade positiva e pertence à família *Picornaviridae*. Existem 7 genótipos conhecidos deste vírus e um único serotipo. A prevalência deste agente é mais comum em zonas populacionais com poucas condições de higiene e onde o saneamento é deficiente. Cerca de 40% dos casos agudos de hepatite são devidos ao VHA, uma vez que este vírus rapidamente se dissemina na população. A principal via de transmissão é a via fecal-oral, através da ingestão de água contaminada, sendo extremamente rara a transmissão por via parenteral. O vírus replica-se ativamente nos hepatócitos, é posteriormente excretado na bÍlis e aparece em quantidades elevadas nas fezes, cerca de 10 dias antes do aparecimento de qualquer sintoma. Para além das fezes, as partículas virais estão também presentes, embora em menor quantidade, no soro e saliva. Existe um período de incubação de aproximadamente um mês após o qual os sintomas se iniciam de modo abrupto, podendo durar até 2 meses. O vírus não apresenta efeito citopático aparente, e os sintomas são uma consequência da resposta do sistema imunitário que leva à morte dos hepatócitos infetados [1, 15, 33].

É uma patologia que tem maior severidade nos adultos e é geralmente assintomática nas crianças. É uma infeção que na sua grande maioria se resolve espontaneamente e nunca

evolui para uma situação crónica, podendo em raros casos surgir complicações como hepatites fulminantes associadas a elevadas taxas de mortalidade [33].

O diagnóstico laboratorial desta infeção é feito através da pesquisa de anticorpos anti-VHA da classe IgM e dos anticorpos totais anti-VHA (IgM e IgG) por serologia (Figura 23). Os anticorpos da classe IgM aparecem durante a fase inicial da doença, atingindo um pico cerca de 2 semanas após a elevação das enzimas hepáticas, diminuindo para níveis não detetáveis em 3-6 meses. Os anticorpos IgG aparecem pouco depois do início da doença e persistem por várias décadas, protegendo o indivíduo de reinfeções.



4.4.2 Hepatite B

A hepatite B representa um grave problema de saúde pública, estimando-se que afete mais de 400 milhões de pessoas a nível mundial. A infeção cónica pelo VHB está associada a um elevado número de mortes anualmente devido a cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular [33].

Este vírus pertence à família *Hepadnaviridae*, é esférico, envelopado e com um genoma de DNA de cadeia dupla circular. É o vírus de DNA que infeta o Homem com o genoma mais pequeno. Este vírus possui vários genes que codificam diversas proteínas, sendo os mais importantes o gene S que codifica o antígeno da superfície viral/envelope (AgHBs), o gene C codifica o antígeno do core/cápside (AgHBc) e uma proteína solúvel (AgHBc) que é libertada na corrente sanguínea, o gene P que codifica a DNA polimerase, a RT e uma ribonuclease e ainda o gene X que codifica a proteína X (HBx), uma proteína reguladora [1, 15].

Este vírus encontra-se presente em elevadas quantidades no soro, sendo também encontrado noutros fluídos corporais como sémen, saliva, leite, secreções vaginais/menstruais e ainda no líquido amniótico, aferindo-se então que o VHB pode ser transmitido por contatos sexuais desprotegidos, por via percutânea como transfusões sanguíneas, picadas de agulha (cerca de 30% dos contágios), via vertical e ainda por via mucocutânea quando há alterações na integridade da mucosa que permitam às partículas virais aceder à corrente sanguínea. A ligação do VHB aos hepatócitos é mediada pelo AgHBs, replicando o seu genoma através de um intermediário de RNA, daí a necessidade da RT. O vírus começa a replicar-se nos hepatócitos 3 dias após a sua entrada no organismo, mas a infeção pode estar longos períodos de tempo sem causar lesões hepáticas e sintomas, dependendo este período da via e dose de infeção e ainda da resposta imunitária do próprio indivíduo [1].

Tal como na infeção por VHA, a replicação viral não é diretamente citotóxica, sendo as lesões hepáticas devidas à resposta do sistema imunitário. Devido à imaturidade do seu sistema imunitário, os recém-nascidos e as crianças têm maior dificuldade em debelar a infeção, apresentando muitas das vezes infeções agudas assintomáticas (cerca de 90%), no entanto a sua grande maioria torna-se portador crónico do vírus [15, 33]. Uma destruição contínua do fígado pode originar cirrose, falência hepática e ainda carcinoma hepatocelular (indução contínua da regeneração do fígado pode levar a uma desregulação dos processos de divisão celular), sendo 80% dos casos deste tipo de neoplasia atribuídos a infeções por VHB. Quando um indivíduo está simultaneamente infetado pelo VHD e pelo VHB, há um aumento da severidade da infeção.

A evolução clínica desta doença é condicionada por vários fatores, mas quando a infeção ocorre na idade adulta a maioria dos indivíduos consegue resolver a infeção (ao contrário dos lactentes). Porém alguns indivíduos não conseguem eliminar o VHB evoluindo esta patologia para quadros de hepatite cónica ou hepatite fulminante (Figura 24).

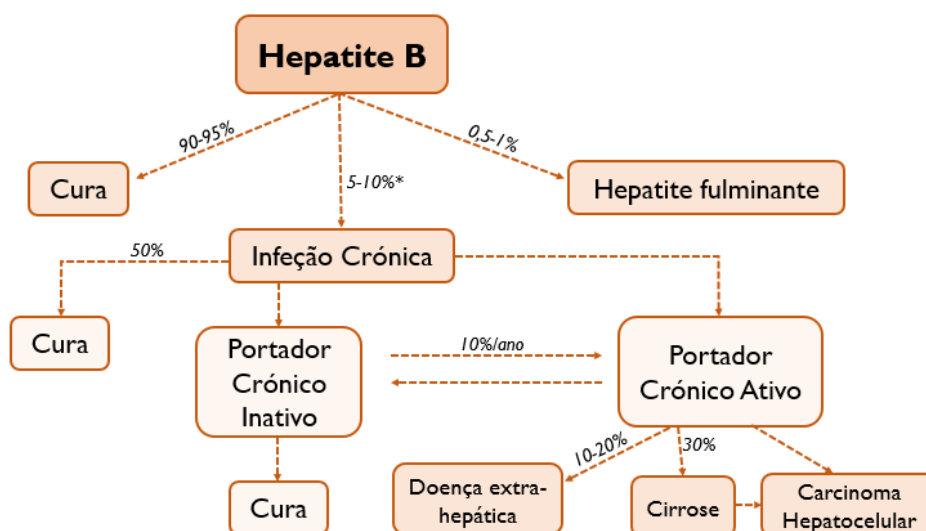


Figura 24: Esquema representativo das possíveis evoluções clínicas de uma infecção por VHB [1]

O diagnóstico da infecção por VHB baseia-se na pesquisa dos diversos antígenos do VHB e anticorpos (Tabela 10). A interpretação dos resultados permite-nos descrever o curso da doença bem como perceber se o indivíduo se encontra ou não infeccioso para os que o rodeiam. Após confirmado o diagnóstico é feita a quantificação da carga viral por técnicas moleculares, metodologias determinantes na monitorização da eficácia dos tratamentos.

Tabela 10: Marcadores serológicos do VHB e o seu significado [15]

AgHBs	Ag da superfície/envelope do VHB; Presente em elevadas quantidades no soro, persistindo ao longo de toda a doença;
AgHBc	Ag da cápside do VHB; Apenas é detetado no núcleo dos hepatócitos.
AgHBe	Proteína solúvel; Evidencia replicação viral ativa e infecciosidade.
Ac Anti-HBs	Imunidade à infecção (infecção passada ou vacinação).
Ac Anti-HBc	Classe IgM evidencia infecção aguda recente; Aparece no início dos sintomas e persiste durante toda a vida; Infecção por VHB atual ou passada.
Ac Anti-HBe	Indicador de baixa replicação viral; Em utentes sujeitos a terapias antivirais indica baixa carga viral.

4.4.2.1 Hepatite B Aguda

Como anteriormente descrito, a grande maioria das hepatites agudas apresenta sintomas inespecíficos, sendo muitas das vezes totalmente assintomática. A maioria dos adultos consegue resolver a infecção, salvo raras exceções. O período de incubação da infecção é de cerca de 3 meses após os quais os sintomas se iniciam de forma insidiosa. O AgHBs é o

primeiro marcador a ser detetável no soro, mesmo antes do aparecimento de qualquer sinal clínico de hepatopatia, persistindo durante toda a evolução da infeção.

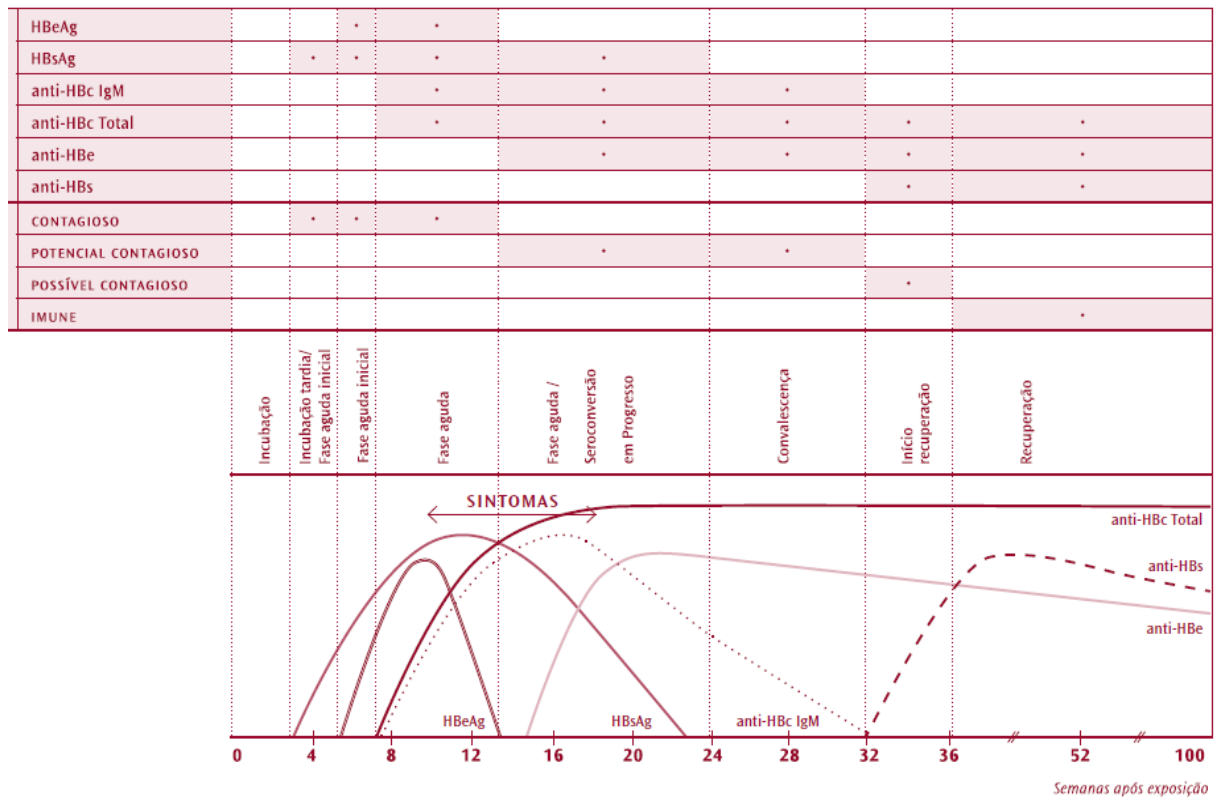


Figura 25: Perfil serológico de uma infeção aguda pelo HBV (<https://www.germanodesousa.com>)

Inicialmente há elevadas taxas de replicação viral evidenciados pela presença do AgHBs, AgHBe e ainda do próprio DNA do VHB no soro, indicando a presença de um elevado número de partículas virais em circulação, encontrando-se o indivíduo numa fase em que é muito contagioso. No entanto o valor das transaminases hepáticas ainda se encontra normal. Numa segunda fase inicia-se uma resposta imune onde há destruição dos hepatócitos e consequente elevação dos marcadores de função hepática, coincidindo com o aparecimento dos sintomas.

Nesta fase começam também a ser detetados os Ac anti-HBc que persistem durante toda a vida do doente. Por fim, quando há resolução da infeção há uma diminuição/término da replicação viral, o AgHBe é gradualmente substituído pelo Ac anti-HBe (desaparece ao fim de cerca de 6 meses), sendo também nesta altura que os valores das transaminases normalizam e, em último lugar o AgHBs desaparece, uma vez que passa a ser detetável o Ac anti-HBs que confere imunidade (Figura 25) [1, 33].

4.4.2 Hepatite B Crónica

Considera-se que um indivíduo tem uma infeção crónica pelo VHB quando o AgHBs persiste por mais de 6 meses. A maioria destas infeções permanece assintomática durante

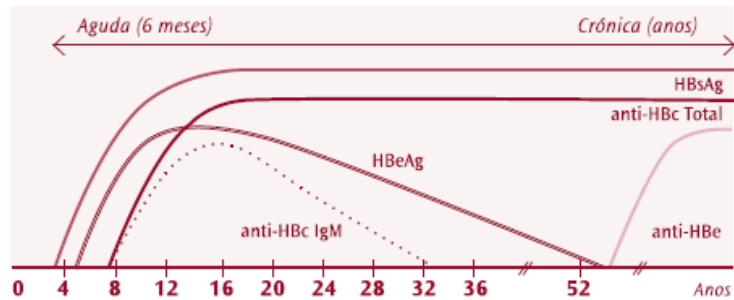


Figura 26: Perfil serológico de uma infeção crónica pelo HBV (<https://www.germanodesousa.com>)

muitos anos, no entanto há sempre um risco de progressão para uma infeção ativa que pode levar a quadros de cirrose, carcinoma hepatocelular e ainda doenças extra-hepáticas que, na sua maioria são reações de hipersensibilidade devido aos imunocomplexos do AgHBs com o seu respetivo anticorpo, podendo levar a erupções cutâneas, artrite, glomerulonefrites, entre outros. Durante a infeção crónica pode haver uma seroconversão, onde o AgHBe é substituído pelo seu anticorpo (Figura 26) [1, 15, 33].

4.4.3 Hepatite C

Estima-se que existam cerca de 170 milhões de portadores de VHC a nível mundial, correspondendo a cerca de 3% da população, e que por ano morrem mais de 350 mil pessoas por doença hepática associada ao VHC. Este vírus foi identificado pela primeira vez em 1989 e pertence à família *Flaviviridae*. É um vírus envelopado, esférico e com um genoma de RNA de cadeia simples com polaridade positiva. O genoma do VHC tem uma elevada variabilidade genética uma vez que apresenta elevadas taxas de replicação e a sua RNA polimerase para além de cometer uma elevada percentagem de erros não apresenta qualquer mecanismo de correção/verificação dos mesmos, causando mutações que facilitam o escape do vírus ao sistema imunitário. Estão descritos 6 genótipos de VHC e mais de 100 subtipos. A determinação do genótipo ajuda na previsão da eficácia terapêutica, havendo alguns genótipos que respondem melhor à terapêutica do que outros [1, 15, 33].

Antes do início da pesquisa de VHC nos doadores de sangue em 1992, a principal via de transmissão deste vírus era através de transfusões sanguíneas. Atualmente, a principal forma de transmissão é por via percutânea, podendo também ocorrer por via sexual e por via vertical. Esta infeção evolui com muita frequência para formas crónicas. A elevada incidência de portadores assintomáticos promove a disseminação do vírus pela comunidade, uma vez que mesmo assintomático, um indivíduo com infeção crónica por VHC pode produzir até

cerca de 10^{12} partículas virais por dia, estimando-se que 40% das hepatites crónicas são devidas ao VHC.

A infeção apresenta um período de incubação de 6-12 semanas, e a maioria dos indivíduos é assintomática durante a fase aguda, o que dificulta bastante o diagnóstico. Os sintomas resultam da resposta imune que destrói as células infetadas. Esta fase aguda pode apresentar 3 quadros de progressão: pode haver uma resolução da infeção e recuperação (15%); pode ocorrer evolução para infeção crónica, com possível evolução para hepatopatias (70%) e ainda uma evolução rápida e severa para um quadro clínico de cirrose (15%).

A maioria dos casos de infeções crónicas por VHC são caracterizadas por longos períodos assintomáticos (20-30 anos), podendo os doentes ter sintomas inespecíficos como fadiga. Um elevado número de infetados corre o risco de progressão para cirrose e para carcinoma hepatocelular, e em fases mais avançadas apenas um transplante hepático permite a sobrevivência do doente. Esta progressão pode ser acelerada por alguns fatores de risco como o consumo de álcool ou a coinfeção com o VIH (Figura 27) [1, 15, 33].

A nível laboratorial é feita uma pesquisa de anticorpos anti-VHC. Estes anticorpos podem ser detetados em cerca de 50-70% dos doentes no início da doença clínica, enquanto que em alguns pode demorar até 6 semanas a serem detetáveis na corrente sanguínea. A pesquisa destes anticorpos permite-nos concluir que o indivíduo esteve em contacto com o VHC, mas não nos permite perceber se é uma infeção aguda, passada ou até mesmo crónica. No CMLGS quando um resultado é positivo para estes anticorpos, o teste é repetido em duplicado e, caso se confirme o resultado, é feito um pedido ao laboratório central para a realização de um teste confirmatório por outro método. Quando confirmado o diagnóstico é feita a quantificação do RNA viral, um parâmetro muito útil na monitorização de doentes sujeitos a tratamentos com antivirais.

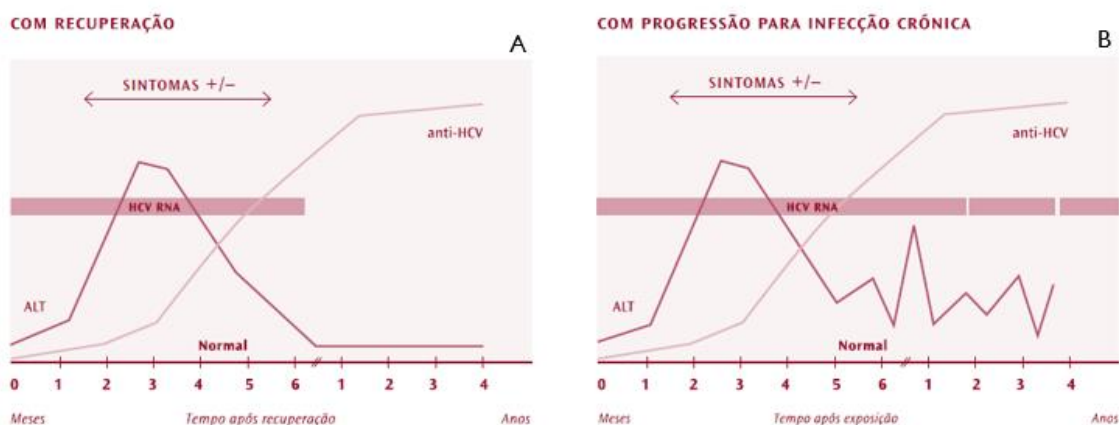


Figura 27: Perfil serológico de uma infeção pelo VHC. **(A)**- Infeção aguda; **(B)**- Infeção crónica. (<https://www.germanodesousa.com>)

4.5 Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um vírus ubíquo que infeta o Homem, sendo um importante agente patogénico em todos os grupos etários. Apesar de ter uma distribuição universal, locais com higiene deficiente e poucas condições socioeconómicas (como ocorre nos países em desenvolvimento) facilitam a disseminação da doença na população. Estima-se que o CMV infete cerca de 1% de todos os recém-nascidos e pelo menos 50-80% dos adultos até aos 40 anos de idade, sendo a causa viral mais comum da existência de defeitos congénitos. As infeções são geralmente assintomáticas, no entanto é um agente oportunista que pode causar patologias severas em indivíduos imunocomprometidos [1, 48].

É um vírus pertence à família *Herpesviridae* e à subfamília *Betaherpesvirinae*. O nome citomegalovírus deriva do facto de as células por ele infetadas ficarem gigantes, com inclusões intranucleares e citoplasmáticas. Apresenta um genoma de DNA e replica-se em vários tipos de células como linfócitos, leucócitos, monócitos, fibroblastos, entre outros [48, 49].

O CMV pode ser detetado na urina, sangue, saliva, lágrimas, leite, sêmen, fezes, líquido amniótico, secreções vaginais, entre outros, sendo transmitido por exposição direta a fluídos corporais infetados, relações sexuais desprotegidas, transfusões sanguíneas, transplante de órgãos ou por via congénita (intrauterina, perinatal ou pós-natal). Tem um tempo de incubação entre 20 a 60 dias, período no qual há uma elevada taxa de replicação viral, facilitando a disseminação do vírus pelo organismo. Este vírus tem a capacidade de estabelecer infeções latentes que podem ser reativadas por quadros de imunossupressão. Em hospedeiros imunocompetentes as infeções são normalmente assintomáticas, podendo os indivíduos apresentar um quadro semelhante ao da mononucleose. A incidência da infeção é maior entre os 2-3 anos de idade. A maioria das infeções é resolvida, mas a excreção de partículas virais nos fluídos biológicos pode persistir durante meses/anos [1].

É fulcral que a pesquisa do CMV seja feita em grávidas, uma vez que é a infeção viral mais comum de ocorrer num feto (15% dos nado-mortos apresentam infeção por CMV). As consequências da infeção do feto são variáveis, podendo ocorrer uma infeção ligeira ou evoluir para quadros de doença severa e disseminada. O risco de infeção congénita é maior quando a mãe desenvolve a primoinfeção durante a gravidez, estimando-se que cerca de 30-40% dos fetos serão afetados, 10% dos quais com doença grave. Quando se trata de uma reinfeção, os anticorpos maternos já existentes conferem algum tipo de proteção, sendo apenas infetados entre 2 a 3% dos fetos [48, 49].

Uma infeção congénita pode levar ao desenvolvimento da doença das inclusões citomegálicas, patologia caracterizada por petéquias, icterícia, hepato-esplenomegalia,

microcefalia, atraso no crescimento, entre outros, havendo uma taxa de mortalidade que ronda os 20-30%. Cerca de 25% dos recém-nascidos clinicamente assintomáticos no nascimento podem vir a ter manifestações tardias da doença como alterações psicomotoras, perdas de audição e visão.

Em indivíduos imunocomprometidos o CMV pode causar doenças severas como retinite, cegueira, pneumonia, colite, esofagite ou ainda uma doença disseminada.

O diagnóstico desta infeção é feito através da pesquisa de anticorpos específicos IgG e IgM, que avaliam o estado de imunidade do utente (Tabela II). Para prevenir a infeção do feto, a pesquisa destes anticorpos deve ser efetuada previamente à conceção, de modo a que, em caso de suspeita clínica/ecográfica de infeção por CMV durante a gravidez, possam ser comparados os títulos de anticorpos. No CMLGS quando um resultado é positivo para a pesquisa destes anticorpos, o teste é repetido e, caso se confirme o resultado, é feito um pedido ao laboratório central para a realização de um teste confirmatório por outro método.

Tabela II: Interpretação dos resultados da pesquisa de anticorpos anti-CMV (IgG e IgM) [49]

Resultado serológico	Interpretação	Medidas recomendadas
IgG (-) IgM (-)	Não há imunidade contra o CMV.	Grávida deve receber informações sobre medidas profiláticas.
IgG (+) IgM (-)	Valores médio/elevados de IgG indicam imunidade estabelecida ou infeção recente; Com valores baixos de IgG, o ensaio deve ser repetido após 4 semanas;	<u>Após repetição:</u> Se o título de IgG aumentar 4x (infeção por CMV sem IgM); Título de IgG aumenta/aparecimento de IgM (reinfeção); Se o valor se mantiver, indica uma imunidade antiga.
IgG (-) IgM (+)	Início de infeção ou IgM não específica; Repetição da análise ao fim de 4 semanas	<u>Após repetição:</u> Se o valor se mantiver estável trata-se de uma IgM não específica Aumento do título e/ou aparecimento de IgG indicam primoinfeção.
IgG (+) IgM (+)	Infeção recente; Pode tratar-se de um falso positivo* (reatividade cruzada com fator reumatoide).	Realização de teste confirmatório por outro método no laboratório central.

*Em casos raros as IgM podem persistir até 9 meses na corrente sanguínea, complicando a interpretação dos resultados

4.6 Rubéola

O agente etiológico da rubéola é um vírus pertencente à família *Togaviridae* e o Homem é o único hospedeiro. É um vírus envelopado de RNA de cadeia simples com polaridade positiva, infectando o trato respiratório superior, não causando aparentemente efeito citopático a nível celular. Este vírus é transmitido por contato direto com secreções nasofaríngeas, sendo normalmente adquirido na infância, podendo haver também uma transmissão por via vertical. É uma doença que facilmente se dissemina numa comunidade uma vez que o indivíduo é contagioso antes do aparecimento dos sintomas e após o término dos mesmos. Apresenta uma distribuição mundial, tendo uma maior incidência na primavera. Apesar de ser uma patologia geralmente benigna e autolimitada, a ocorrência da primoinfeção materna no 1º trimestre de gravidez pode conduzir a graves alterações estruturais no feto, como malformações congénitas e atraso mental [15, 49].

Apresenta um período de incubação entre 14-21 dias, durante o qual há uma multiplicação do vírus no trato respiratório superior e uma migração do mesmo para os nódulos linfáticos. Há um aumento da carga viral em circulação, que vai estimular a produção de anticorpos. A produção destes anticorpos coincide com o desenvolvimento dos sintomas como a erupção cutânea, sugerindo que esta manifestação provavelmente deriva da resposta imune. Para além da erupção cutânea, outros sintomas incluem linfadenopatias, febre baixa e um mau estar geral, estimando-se que 20-50% dos casos são assintomáticos. No entanto, em alguns adultos podem ser observados sinais clínicos mais severos como trombocitopenia, artrites transitórias e encefalite [15].

Os anticorpos IgM permanecem até 6 semanas após a resolução da doença, e os anticorpos IgG ficam no organismo toda a vida, conferindo imunidade permanente (mães imunes conferem imunidade ao feto).

O vírus tem a capacidade de se replicar na placenta, e a infeção materna pode ser transmitida ao feto, sendo esta patologia das principais causas de malformações congénitas. A intensidade/severidade da doença a nível fetal parece estar dependente da idade gestacional, agressividade do próprio vírus e ainda a suscetibilidade genética de cada indivíduo. Cerca de 85% dos fetos infectados durante o 1º trimestre vão desenvolver malformações, baixando este valor para os 16% quando a infeção ocorre no 2º trimestre de gravidez. Apesar do vírus não ter qualquer efeito citopático, há uma diminuição da taxa de crescimento das células infectadas, levando à hipoplasia de vários órgãos e consequentes alterações estruturais no recém-nascido [15, 50].

A infecção fetal pode levar a abortos espontâneos, nados-mortos e malformações congênitas, podendo, no entanto, haver recém-nascidos completamente assintomáticos. As anomalias fetais provocadas pelo vírus da rubéola podem ser agrupadas em três categorias distintas: anomalias transitórias que podem persistir mais de seis meses e incluem hepatoesplenomegalia, icterícia, atraso no crescimento e ainda encefalite; anomalias permanentes como surdez, cardiopatias, cataratas, surdez, atraso mental e déficit motor; anomalias de manifestação tardia como endocrinopatias, diabetes, doenças da tiroide, hipertensão sistêmica, entre outros [49, 50].

Na rubéola não é possível fazer um diagnóstico clínico uma vez que os sintomas não são específicos, necessitando sempre de testes serológicos para confirmar a suspeita de infecção por este vírus. O diagnóstico é então feito através da detecção do RNA viral ou da presença de anticorpos específicos IgM/IgG (Tabela 12).

Para prevenir a infecção do feto, a pesquisa destes anticorpos deve ser efetuada previamente à concepção, de modo a que, no caso de a mulher não estar imunizada, lhe possa ser administrada a vacina (atualmente esta já faz parte do plano nacional de vacinação). No CMLGS quando um resultado é positivo para a pesquisa destes anticorpos, o teste é repetido e caso se confirme o resultado, é feito um pedido ao laboratório central para a realização de um teste confirmatório por outro método.

Tabela 12: Interpretação dos resultados da pesquisa de anticorpos anti-rubéola (IgG e IgM) [49]

Resultado serológico	Interpretação	Medidas recomendadas
IgG (-) IgM (-)	Não há imunidade contra o vírus da rubéola.	Grávida deve receber informações sobre medidas profiláticas.
IgG (+) IgM (-)	Valores médio/elevados de IgG indicam imunidade estabelecida ou infecção recente; Com valores baixos de IgG, o ensaio deve ser repetido após 2/3 semanas.	<u>Após repetição:</u> Se o título de IgG aumentar 4x (infecção sem IgM); Título de IgG aumenta/aparecimento de IgM (reinfecção) Se o valor se mantiver, indica uma imunidade antiga.
IgG (-) IgM (+)	Início de infecção ou IgM não específica; Repetição da análise ao fim de 2/3 semanas.	<u>Após repetição:</u> Se o valor se mantiver estável trata-se de uma IgM não específica Aumento do título e/ou aparecimento de IgG indicam primo-infecção.
IgG (+) IgM (+)	Infeção recente	Realização de teste confirmatório por outro método no laboratório central.

4.7 Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, um parasita intracelular obrigatório que tem uma ampla distribuição mundial. Pode infetar uma grande variedade de animais como aves e mamíferos, facilitando a sua transmissão, tendo como hospedeiro definitivo o gato doméstico (único onde ocorre a reprodução sexuada). Este parasita apresenta três morfologias principais durante o seu ciclo de vida: os taquizoítos são a forma invasiva resultante da reprodução assexuada, sendo observados na fase aguda de infecção e tendo taxas elevadas de multiplicação; os quistos que contém bradizoítos no seu interior, formas assexuadas com baixas taxas de multiplicação, encontrando-se em diversos tecidos e por fim temos os ooquistos, que resultam da reprodução sexuada do parasita, existindo apenas no seu hospedeiro definitivo, o gato [1, 49].

Este parasita invade as células da mucosa intestinal do gato, onde ocorre a reprodução sexuada. Da fusão dos gametas sexuais resulta um ooquisto que é libertado no lúmen intestinal, sendo posteriormente eliminado nas fezes do gato. Este ooquisto encontra-se numa forma imatura/não infetante, sofrendo um processo de maturação no exterior que dura cerca de 2-5 dias, de forma a tornar-se capaz de infetar outros organismos.

Estes ooquistos ao serem ingeridos por hospedeiros intermediários, como o ser humano, continuam o seu ciclo de vida, reproduzindo-se assexuadamente, podendo estabelecer uma infecção. Os ooquistos ingeridos libertam esporozoítos que evoluem para taquizoítos que atravessam a mucosa intestinal, entram na circulação sanguínea e infetam células como macrófagos e linfócitos, o que vai permitir a disseminação do parasita pelo organismo. Estes taquizoítos multiplicam-se rapidamente, e são os responsáveis pelos sinais clínicos da fase aguda da infecção, invadindo posteriormente órgãos e tecidos (o parasita tem tropismo por células do pulmão, coração e ainda células nervosas, como as presentes no cérebro e na retina). Uma vez estabelecidos nos tecidos, formam quistos tecidulares (que contém bradizoítos, formas parasitárias de multiplicação lenta) que entram numa fase de latência ou estabelecem uma infecção crónica [1].

As principais formas de transmissão do *Toxoplasma gondii* são através da ingestão de ooquistos provenientes de fezes de gatos infetados e ingestão de carne mal cozinhada com quistos tecidulares. Pode haver também uma transmissão do parasita através de transfusões sanguíneas e transplante de um órgão infetado com quistos, não sendo, contudo, vias muito comuns [49].

A maioria das infeções são benignas e assintomáticas, no entanto quando causam doença esta assemelha-se à mononucleose. Os sintomas são devidos à destruição dos tecidos

à medida que são invadidos pelo parasita. A severidade da infecção é determinada pelo estado imunitário do indivíduo, sendo a toxoplasmose um grave problema em doentes imunocomprometidos. Nestes indivíduos a doença pode ter manifestações severas, normalmente em consequência da reativação de uma infecção que se encontrava em fase de latência, podendo levar a quadros de encefalite, miocardite, pneumonite e coriorretinite.

Outro grupo de risco são as grávidas, uma vez que uma primoinfecção durante a gravidez e a possível transmissão transplacentária pode ter efeitos devastadores para o feto. Quanto mais cedo ocorre a infecção, menor a probabilidade de transmissão do parasita ao feto, no entanto a severidade da doença é maior, ou seja, é mais frequente haver transmissão no 2º e 3º trimestre de gestação, sendo a doença menos grave e muitas vezes assintomática. A infecção congénita pode levar à morte fetal, coriorretinite, calcificações intracranianas, hidrocefalo, distúrbios psicomotores, entre outros. Muitos recém-nascidos podem ser assintomáticos à nascença e desenvolver a doença anos mais tarde [49, 51].

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser feito através da demonstração da presença do parasita nos tecidos/flúidos biológicos usando técnicas de biologia molecular e ainda observações de preparações coradas. No entanto, a maior parte dos laboratórios utiliza testes serológicos, onde se faz a titulação dos anticorpos específicos IgM/IgG (Tabela 13).

Para prevenir a infecção do feto, a pesquisa destes anticorpos deve ser efetuada previamente à concepção, de modo a que, no caso de a mulher não estar imunizada, esta deverá ser aconselhada a ter medidas preventivas como evitar contacto com fezes de gato, utilizar luvas durante a prática de jardinagem, ingerir os alimentos bem cozinhados e lavar cuidadosamente as frutas e os vegetais [49]. No CMLGS quando um resultado é positivo para a pesquisa destes anticorpos, o teste é repetido e, caso se confirme o resultado, é feito um pedido ao laboratório central para a realização de um teste confirmatório por outro método.

Tabela 13: Interpretação dos resultados da pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma (IgG e IgM) [49]

Resultado serológico	Interpretação	Medidas recomendadas
IgG (-) IgM (-)	Ausência de imunidade	Grávida deve receber informações sobre medidas profiláticas.
IgG (+) IgM (-)	Valores médio/elevados de IgG indicam imunidade estabelecida ou infecção recente; Com valores baixos de IgG, o ensaio deve ser repetido após 3 semanas;	<u>Após repetição:</u> Se o título de IgG aumentar 4x (infecção sem IgM); Título de IgG aumenta/aparecimento de IgM (reinfeção) Se o valor se mantiver, indica uma imunidade antiga.
IgG (-) IgM (+)	Início de infecção ou IgM não específica; Repetição da análise ao fim de 3 semanas	<u>Após repetição:</u> Se o valor se mantiver estável trata-se de uma IgM não específica Aumento do título e/ou aparecimento de IgG indicam primo-infecção.
IgG (+) IgM (+)	Infeção recente	Realização de teste confirmatório por outro método no laboratório central.

4.8 Caso Clínico

Uma utente do sexo feminino, com 48 anos apresenta-se nas urgências com icterícia. Relata que na última semana tem tido febre, náuseas, vômitos, fadiga e dor no quadrante abdominal superior. Foi feito um exame físico onde se observou a cor amarelada da pele e mucosas, o abdómen encontrava-se volumoso devido a uma hepato-esplenomegalia. Foram prescritas diversas análises, cujos resultados se encontram na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados laboratoriais do caso clínico

Parâmetro Analítico	Resultado	Valores de Referência
AST	1950 U/L	(15-37 U/L)
ALT	2191 U/L	(16-63 U/L)
GGT	106 U/L	(15-85 U/L)
Bilirrubina total	3,8 mg/dL	(<1,2 mg/dL)
AgHBs	Positivo	Negativo (<1,00)
Ac anti-HBc Total	Reativo	Não reativo (<1,00)
AgHBe	Positivo	Negativo (<1,00)

Discussão

Associando os sinais clínicos da utente com este painel de resultados podemos concluir que a utente foi infetada pelo VHB e se encontra numa fase de infeção aguda, uma vez que os antigénios HBs e HBe são positivos, indicando que está a ocorrer replicação viral. São prescritos à utente fármacos para tratamento dos sintomas (febre e náuseas). É lhe recomendado repouso e é também aconselhada a evitar álcool e outros agentes que possam ser nocivos para o fígado. Ao fim de 4 semanas terá de repetir as análises para verificar se a infeção foi resolvida.

5. Conclusão

O Mestrado em Análises Clínicas fornece-nos uma grande componente teórica sobre as diversas áreas laboratoriais, para além de ainda nos fazer conjugar todos os nossos conhecimentos nos diversos casos clínicos que nos são apresentados. Apesar de toda esta bagagem, carece de componente prática, e este estágio vem preencher esta lacuna, permitindo-nos aplicar na prática todos os conceitos aprendidos ao longo destes dois anos. Desta forma considero que este estágio curricular assumiu um papel fundamental na minha formação académica.

Este estágio foi extremamente enriquecedor não só a nível profissional, mas também pessoal. Em termos profissionais consegui adquirir capacidades de organização, coordenação, responsabilidade e ainda destreza nas técnicas laboratoriais anteriormente aprendidas bem como contactei com novas técnicas. A nível pessoal vivenciei a realidade de estar no mundo do trabalho, fomentei as minhas relações interpessoais e o espírito de trabalho de equipa.

Adquiri novas perspetivas sobre a área da saúde, tendo sido bastante evidente que num laboratório de grande escala, com um elevado número de amostras como o Germano de Sousa, a automação está cada vez mais presente para termos melhores tempos de resposta. Apesar disto, não podemos desprezar o papel dos técnicos, quer na resolução de pequenas avarias, manutenções e ainda na própria validação dos resultados, garantindo que o utente/clínico recebe os resultados corretos, uma vez que não nos podemos esquecer que não são só determinações analíticas em amostras biológicas, estando em jogo a evolução clínica e até mesmo a vida dos utentes.

Notei uma falta de comunicação entre os clínicos e o laboratório, o que leva muitas vezes a não serem pedidos os ensaios mais indicados, as colheitas não serem efetuadas da melhor forma, havendo ainda uma dificuldade na interpretação dos painéis analíticos, problemas que poderiam ser ultrapassados se houvesse diálogo e interajuda entre as duas partes.

Apesar de saber que nos dias de hoje existem poucas vagas de emprego nesta área, facto que pode ser dificultado pela minha falta de formação na colheita de amostras, este estágio fez-me aumentar ainda mais o gosto pelas análises clínicas, tendo a convicção que quero trabalhar nesta área.

Foram seis meses que passaram “a voar” e tenho a certeza que não poderia ter realizado o meu estágio em melhor estabelecimento, tendo tido sempre apoio de uma equipa excepcional. Não tenho palavras para descrever esta experiência única e sinto-me muito mais capaz de enfrentar o futuro que se avizinha.

6. Referências Bibliográficas

1. MURRAY, P. R.; ROSENTAL, K. S.; PFALLER, M. A. – **Medical Microbiology**. 8th ed. Elsevier Health Sciences, 2016. ISBN 978-0-323-29956-5.
2. FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. – **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 12th ed. Mosby Elsevier Health Sciences, 2007. ISBN 978-0-323-07502-2.
3. BAREFANGER, Joan; DRAKE, Cherry; KACICH, Gail – **Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing**. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:5 (1999), 1415-1418.
4. GOPI, A. *et al.* – **Time to positivity of microorganisms with BACTEC 9050: na 18-month study among children of 28 Days to 60 Months in a South Indian tertiary hospital**. *International Journal of Microbiology Research*. 2:1 (2011), 12-17.
5. GARROTE, F. G.; CERCENADO, E.; BOUZA, E. – **Evaluation of a New System, VITEK 2, for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci**. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:7 (2000), 2108-2111.
6. LIGOZZI, M. *et al.* – **Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci**. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:5 (2002), 1681-1686.
7. PINCUS, D. H. – **Microbial Identification Using the BioMérieux Vitek® 2 System**. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. (2010), 1-32
8. MCGREGOR, A. *et al.* – **The MicroScan Walkaway diagnostic microbiology system – An evaluation**. *Pathology*. 27:2 (1995), 172-176.
9. RHOADS, S. *et al.* – **Comparison of MicroScan Walkaway System and Vitek System for Identification of Gram-Negative Bacteria**. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:11 (1995), 3044-3046.
10. YARBROUGH, M. L. *et al.* – **Culture of Urine Specimens by Use of chromID CPS Elite Medium Can Expedite *Escherichia coli* Identification and Reduce Hands-On Time in the Clinical Laboratory**. *Journal of Clinical Microbiology*. 54:11 (2016), 2767-2773.
11. WIESENFELD, H. C. *et al.* – **Self-collection of Vaginal Swabs for the Detection of Chlamydia, Gonorrhea, and Trichomoniasis: Opportunity to Encourage**

- Sexually Transmitted Disease Testing Among Adolescents.** Sexually Transmitted Diseases. 28:6 (2001), 321-325.
12. BUTTER, M. N. W.; DE MOOR, C. E. – **Streptococcus agalactiae as a cause of meningites in the newborn, and of bacteraemia in adults.** Antoine van Leeuwenhoek. 33:1 (1967), 439-450.
 13. FRANCIOSI, R. A; KNOSTMAN, J. D.; ZIMMERMAN, R. A. – **Group B streptococcal neonatal and infant infections.** The Journal of Pediatrics. 82:4 (1973), 707-718.
 14. TAZI, A. *et al.* – **Comparative evaluation of Strepto B ID@chromogenic medium and Granada media for the detection of Group B streptococcus from vaginal samples of pregnant women.** Journal of Microbiological Methods. 73:3 (2008), 263-265.
 15. BROOKS, G. F. *et al.* – **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick Adelberg.** 26th ed. AMGH Editora, 2014. ISBN: 978-85-8055-335-2.
 16. WHO Scientific Working Group – **Enteric infections due to Campylobacter, Yersinia, Salmonella, and Shigella.** Bulletin of the World Health Organization. 58:4 (1980), 519-537.
 17. BLASER, M. J.; PARSONS, R. B.; WANG, W. L. L. – **Acute Colitis Caused by Campylobacter fetus ss. Jejuni.** Gastroenterology. 78:3 (1980), 448-453.
 18. BLASER, M. J. *et al.* – **Campylobacter Enteritis: Clinical and Epidemiologic Features.** Annals of internal medicine. 91:2 (1979), 179-185.
 19. KELLY, C. P.; LAMONT, J. T. – **Clostridium difficile – More Difficult Than Ever.** The New England Journal of Medicine. 359:18 (2008), 1932-1940.
 20. MCFARLAND, L. V. *et al.* – **Nosocomial Acquisition of Clostridium difficile infection.** The New England Journal of Medicine. 320:4 (1989), 204-210.
 21. KELLY, C. P.; POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J. T. – **Clostridium difficile colitis.** The New England Journal of Medicine. 330:4 (1994), 257-262.
 22. KIM, H. *et al.* – **Evaluation of a Rapid Membrane Enzyme Immunoassay for the Simultaneous Detection of Glutamate Dehydrogenase and Toxin for the Diagnosis of Clostridium difiicile infection.** Annals of Laboratory Medicine. 34:3 (2014), 235-239.
 23. MANSER, M. M; SAEZ, A. C. S.; CHIODINI, P. L. – **Faecal Parasitology: Concentration Methodology Needs to be Better Standardised.** Plos neglected tropical diseases. 10:4 (2016).

24. ANÉCIMO, R. S. *et al.* – **Adaptation of Ritchie’s Method for Parasites Diagnosing with Minimization of Chemical Products.** Interdisciplinary perspectives on infectious diseases. 2012 (2012).
25. APARNA, M. *et al.* – **Assessment of Sputum Quality and Its Importance in the Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis.** Archives of Clinical Microbiology. 8:4 (2017).
26. WERTHEIM, F. L. *et al.* – **The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections.** The Lancet infectious diseases. 5:12 (2005), 751-762.
27. KLUYTMANS, J.; BELKUM, A. V; VERBRUGH, H. – **Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks.** Clinical Microbiology Reviews. 10:3 (1997), 505-520.
28. RUPP, M. E.; FEY, P. D. – **Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)- Producing Enterobacteriaceae.** Drugs. 63:4 (2003), 353-365.
29. COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. – **Increasing prevalence of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Europe.** Eurosurveillance. 13:47 (2008).
30. DRIEUX, L. *et al.* – **Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide.** Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 14 (2008), 90-103.
31. OWEN, J. A. *et al.* – **Kuby Immunology.** 7th ed. W. H. Freeman and Company, 2013. ISBN 978-14641-3784-6.
32. MURPHY, K. *et al.* – **Janeway’s Immunobiology.** 8th Garland Science, 2012. ISBN 978-0-8153-4243-4.
33. ZABRISKIE, J. B. – **Essential Clinical Immunology.** Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-51681-5.
34. AROSA, F. A.; CARDOSO, E. M.; PACHECO, F. C. – **Fundamentos de Imunologia.** 2ª ed. Lidel – edições técnicas, lda., 2012. ISBN 978-972-757-856-6.
35. BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E. – **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** 7th ed. Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-8166-8.
36. CINQUANTA, L.; FONTANA, D. E.; BIZZARO, N. – **Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?** Autoimmun Highlights. 8:9 (2017).
37. CHEN, W. *et al.* – **Chemiluminescent Immunoassay and Its Applications.** Chinese Journal of Analytical Chemistry. 40:1 (2012), 3-10.

38. WEEKS, I. *et al.* – **Acridinium Esters as High-Specific-Activity Labels in Immunoassay.** *Clinical Chemistry*. 29:8 (1983), 1474-1479.
39. PERKINS, L. G *et al.* – **Serum Tumor Markers.** *American Family Physician*. 68:6 (2003), 1075-1088.
40. GOONETILLEKE, K. S.; SIRIWARDENA, A. K. – **Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer.** *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 33:3 (2007), 266-270.
41. JACOBS, I.; BAST JR, R. C. – **The CA 125 tumor-associated antigen: a review of the literature.** *Human Reproduction*. 4:1 (1989), 1-12.
42. DUFFY, M. J.; EVOY, D.; MCDERMOTT, E. W. – **CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer.** *Clinica chimica acta*. 411 (2010), 1869-1874.
43. JOHNSON, P. J. – **The role of sérum alfa-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocelular carcinoma.** *Clinics in liver disease*. 5:1 (2001), 145-159.
44. BENCHIMOL, S. *et al.* – **Carcinoembryonic Antigen, a Human Tumor Marker, Functions as na Intercellular Adhesion Molecule.** *Cell*. 57:2 (1989), 327-334.
45. STAMEY, T. A. *et al.* – **Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate.** *New England Journal of Medicine*. 317:15 (1987), 909-916.
46. Norma da Direcção-Geral da Saúde – **Prescrição e Determinação do Antigénio Específico da Próstata.** N°060/2011, 29/12/2011.
47. Norma da Direcção-Geral da Saúde – **Diagnóstico e Rastreio Laboratorial da Infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana.** N°058/2011, 28/12/2011.
48. KENNESON, A.; CANNON, M. J. – **Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection.** *Reviews in medical virology*. 17:4 (2007), 253-276.
49. Divisão de Saúde Materna, Infantil e dos Adolescentes – **Saúde Reprodutiva: Doenças Infecciosas e Gravidez: Orientações Técnicas II.** Lisboa: Direcção-Geral da Saúde, 2000.
50. DUSZAK, R. S. – **Congenital rubella syndrome-major review.** *Optometry-Journal of the American Optometric Association*. 80:1 (2009), 36-43.
51. JONES, J. L. *et al.* – **Congenital Toxoplasmosis: A review.** *Obstetrical & gynecological survey*. 56:5 (2001), 296-305.