

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Corte Gonçalves Fernandes

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

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

Outubro de 2020

Catarina Corte Gonçalves Fernandes

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

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

Outubro 2020

“ Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre. “

Charles Chaplin

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Miguel Matos, por dar o seu melhor no acompanhamento de todos os alunos e por se mostrar sempre disponível.

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

À professora Doutora Cristina Luxo pela atenção e disponibilidade prestada.

Aos meus pais, o meu principal agradecimento, porque me permitiram ter esta experiência, pelos valores e educação que me transmitiram, pela ajuda que me deram e continuam a dar. Sem eles nada disto teria sido possível.

À minha família por todo o apoio.

Aos meus amigos, de longe e de perto que me deram força e partilharam comigo esta jornada.

Obrigada a todos por terem acreditado nas minhas escolhas, por tudo o que fizeram e fazem.

Índice

Abreviaturas.....	i
Índice de Tabelas	i
Índice de Figuras	iii
Resumo	vi
Abstract	vi
I. Introdução.....	1
II. Caracterização do Laboratório	2
III. Atividades desenvolvidas.....	4
1. Microbiologia	4
1.1 Bacteriologia.....	5
2. Bioquímica	32
3. Imunologia	33
3.1 Imunologia.....	33
3.2 Autoimunidade.....	37
4. Hematologia.....	48
5. Casos Clínicos	50
IV. Controlo de Qualidade.....	54
V. Conclusão.....	55
VI. Bibliografia.....	56
ANEXOS	vii
ANEXO A - Fluxo de Amostras do <i>CoreLab</i>	viii
ANEXO B - Equipamentos do Laboratório de Patologia Clínica do CHUC.....	x
ANEXO C - Valores de Referência	xiii
ANEXO D - Padrões de Fluorescência obtidos por IFI	xv

Índice de Tabelas

Tabela 1 Agrupamentos e formas bacterianas.....	6
Tabela 2 Métodos diretos. Princípios e aplicações.....	6
Tabela 3 Meios de enriquecimento utilizados no laboratório de bacteriologia.....	8
Tabela 4 Meios seletivos e diferenciais utilizados no laboratório de bacteriologia	9
Tabela 5 Cartas de Suscetibilidade Antimicrobiana usadas no VITEK® 2.....	16
Tabela 6 Processamento da amostra de urina.....	17
Tabela 7 Valorização da contagem de colónias bacterianas e continuação do procedimento de identificação.....	18
Tabela 8 Processamento da amostra de fezes.....	19
Tabela 9 Processamento aplicado às hemoculturas introduzidas no BACT/ALERT 3D	21
Tabela 10 Procedimento aplicado às hemoculturas positivas.....	21
Tabela 11 Modo de processamento de cateteres intravenosos	21
Tabela 12 Processamento do LCR.....	22
Tabela 13 Processamento de líquido pleural.....	23
Tabela 14 Processamento de líquido peritoneal e sinovial.....	23
Tabela 15 Infecções do trato respiratório inferior	24
Tabela 16 Infecções do trato respiratório superior	24
Tabela 17 Tabela de Murray e Washington.....	25
Tabela 18 Processamento de expetorações e aspirados transtraqueais.....	25
Tabela 19 Processamento de lavados brônquicos e bronco-alveolares.....	25
Tabela 20 Processamento de exsudados purulentos.....	26
Tabela 21 Processamento de exsudados genitais.....	26
Tabela 22 Meios de cultura utilizados no laboratório de micobacteriologia	28
Tabela 23 Testes de genética molecular para identificação de micobactérias	29
Tabela 24 Parâmetros analisados em Bioquímica Clínica de acordo com a função a que correspondem	32
Tabela 25 Parâmetros analisados pelos equipamentos BN PROSPEC I e II.....	34
Tabela 26 Alterações nas frações constituintes do perfil eletroforético e possível associação a patologias.....	35
Tabela 27 Doenças autoimunes sistémicas, sistemas de órgãos envolvidos e imunopatologia	39
Tabela 28 Doenças autoimunes específicas de órgãos.....	39

Tabela 29 Anticorpos anti-mitochondriais (AMA) num caso de colangite biliar primária.....	44
Tabela 30 Parâmetros do hemograma com leucograma e respetivos valores de referência utilizados no CHUC.....	49
Tabela 31 Resultados iniciais da doente.....	52
Tabela 32 Resultados obtidos por IFI das análises referentes à autoimunidade	53
Tabela 33 Equipamentos existentes no laboratório de Urgência.....	x
Tabela 34 Equipamentos existentes no laboratório de Bioquímica complementares aos existentes no <i>CoreLab</i>	x
Tabela 35 Equipamentos existentes no laboratório de Bacteriologia	xi
Tabela 36 Equipamentos existentes no laboratório de Micobacteriologia.....	xi
Tabela 37 Equipamentos existentes no laboratório de Imunologia	xi
Tabela 38 Equipamentos existentes no laboratório da Autoimunidade	xii
Tabela 39 Equipamentos existentes no laboratório de Hematologia complementares aos existentes no <i>CoreLab</i>	xii
Tabela 40 Valores de Referência dos parâmetros bioquímicos	xiii
Tabela 41 Valores de referência dos parâmetros hematológicos	xiv
Tabela 42 Padrões de fluorescência nucleares.....	xv
Tabela 43 Padrões de fluorescência citoplasmáticos.....	xvi
Tabela 44 Padrões de fluorescência mitóticos.....	xvii

Índice de Figuras

Figura 1 Processo de atividades no Laboratório Clínico de Microbiologia	4
Figura 2 Imagens de bactérias obtidas ao microscópio ótico após coloração de Gram. A. Cocos Gram-positivo B. Bacilos Gram-negativo (Figuras adaptadas de Cappuccino, James G.)	7
Figura 3 A. Sementeira por esgotamento em meio sólido; B. Sementeira quantitativa em meio sólido com ansa calibrada de 1 µL; (Figuras adaptadas de Mahon, Connie). C. Sementeira por dispersão em meio líquido (Figura adaptada de Fonseca et al)	11
Figura 4 A, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com brilho metálico e pigmentação verde das colónias em gelose sangue. B, Espécie mucosa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na GS.....	12
Figura 5 Aspeto das colónias em meio sólido	13
Figura 6 Interpretação quantitativa das colónias bacterianas.....	17
Figura 7 Coloração pelo método de Kinyoun.....	28
Figura 8 GenoType Mycobacterium AS utilizado na diferenciação de espécies não tuberculosas clinicamente relevantes	30
Figura 9 GenoType Mycobacterium CM utilizado na identificação das espécies do complexo <i>M. tuberculosis</i> e na diferenciação de espécies não tuberculosas clinicamente relevantes	30
Figura 10 Geno Type MTBDR plus utilizado na identificação da resistência à rifampicina e à isoniazida.....	31
Figura 11 A. Perfil eletroforético de migração em função da carga. B. Frações identificadas pela eletroforese e proteínas constituintes de cada fração	35
Figura 12 Padrão eletroforético das proteínas urinárias.....	36
Figura 13 IFI para pesquisa de ANAs	41
Figura 14 Padrões de fluorescência ANCA	43
Figura 15 Método de CLIA.....	45
Figura 16 Esfregaço de sangue periférico	48
Figura 17 Exame direto com bacilos Gram positivos com aspeto característico de <i>Listeria monocytogenes</i>	50
Figura 18 Crescimento bacteriano em culturas. A: Cultura em GS. B: Cultura em PVX.....	51
Figura 19 Antibiogramas manuais em e-test e em disco para <i>Listeria monocytogenes</i>	51
Figura 20 Fluxo da origem das amostras no <i>CoreLab</i>	viii
Figura 21 Fluxo das principais extensões de tubos no <i>CoreLab</i>	ix

Abreviaturas

AMA	Anticorpos anti-mitocôndrias
ANA	Anticorpos antinucleares
ANCA	Anticorpos anti-citoplasma de granulócitos
ASMA	Anticorpos anti-músculo liso
BGN	Bacilo Gram Negativo
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Meio de infusão de cérebro-coração)
CBP	Colangite Biliar primária
CEP	Colangite Esclerosante primária
CGP	Coco Gram Positivo
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CIN	Meio para <i>Yersinia</i>
CLED	Meio de Cistina, Lactose Deficiente em Eletrólitos
CM	<i>Cooked Meat</i> (Meio de carne cozida)
CNA	Meio Gelose Sangue, Colistina e Ácido Nalidíxico
CoreLab	Unidade Central de Automatização Laboratorial
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (Comité Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana)
FEIA	Ensaio Imunoenzimático Fluorescente
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>)
HAE	Meio Gelose Chocolate com Bacitracina
HAI	Hepatite autoimune
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HG	Hospital Geral dos Covões
HK	Meio de Tioglicolato
HP	Hospital Pediátrico
IFI	Imunofluorescência Indireta
IOM	Módulo de entrada e saída na cadeia (<i>input output module</i>)
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LKMI	Anticorpos anti-microsomas renais e hepáticos
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i> (Dessorção/

	Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo)
MBB	Maternidade Bissaya Barreto
MDM	Maternidade Daniel de Matos
MH	Meio Muller Hinton
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
PVX	Meio Gelose Chocolate com Piridoxal
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i> (Coeficiente de Variação dos Eritrócitos)
RIA	Radio Imunoensaio
SS	Meio Salmonella - Shigella
StaNeg	Estafilococos coagulase negativa
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
UFC	Unidades Formadoras de Colónia
VCAT	Vancomicina, Colistina, Anfotericina e Trimetropim
VCM	Volume Corpuscular Médio

Resumo

As análises clínicas são essenciais para o prognóstico, diagnóstico e monitorização terapêutica do utente, que são decisivas na prevenção e acompanhamento das mais variadas patologias.

O presente estágio foi realizado com o objetivo de conhecer a realidade prática das atividades desenvolvidas teoricamente como forma de consolidar os conhecimentos obtidos durante o mestrado. É feita uma caracterização do laboratório e a descrição das atividades desenvolvidas, com especial foco para as duas valências escolhidas: Microbiologia Clínica e Imunologia Clínica.

Neste relatório são descritos procedimentos laboratoriais para a identificação, deteção e quantificação de vários elementos biológicos, encontrados em amostras de produtos orgânicos e explicados os critérios na interpretação e validação dos resultados analíticos.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Diagnóstico, Bacteriologia, Imunologia

Abstract

Clinical analysis is essential for the prognosis, diagnosis and therapeutic monitoring of the patient, which are decisive in preventing and monitoring the most varied pathologies.

This report was carried out with the objective of knowing the practical reality as a way to consolidate the knowledge obtained during the master's degree. The laboratory is characterized and the activities developed are described, with special focus on the two chosen areas: Clinical Microbiology and Clinical Immunology.

Laboratory procedures are described for the identification, detection and quantification of various biological elements found in samples of organic products and the criteria for the interpretation and validation of analytical results are explained.

Keywords: Clinical Analysis, Diagnosis, Bacteriology, Immunology

I. Introdução

As análises clínicas compreendem vários domínios científicos que estão na base da previsão, diagnóstico e monitorização da doença. É uma componente do sistema e cuidados de saúde que atua como meio complementar cada vez mais fundamental na medicina moderna. O processo analítico baseia-se em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. Qualquer erro cometido durante uma destas fases, pode influenciar o resultado obtido e acartar consequências para o doente.

Este relatório tem como objetivo descrever o percurso de aprendizagem durante o estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Descreve a consolidação de conhecimentos teóricos, adquiridos durante a formação curricular e sua aplicação na vertente prática, mas também o desenvolvimento de competências analíticas e interpretativas.

Em suma, o Serviço de Patologia Clínica abrange uma vasta gama de áreas de conhecimento, bem como técnicas laboratoriais de rotina hospitalar às quais tive oportunidade de assistir, participar e cimentar conhecimentos anteriormente adquiridos. O apoio de todos os especialistas e técnicos foi fundamental em todas as valências que constituem o laboratório. Neste relatório são abordadas de forma mais completa as áreas da Microbiologia e Imunologia.

II. Caracterização do Laboratório

O Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra está organizado com base em serviços de ação médica dos quais faz parte o Serviço de Patologia Clínica que se localiza no Edifício de São Jerónimo. Este serviço trabalha em conjunto com o Hospital Geral (HG), o Hospital Pediátrico (HP), a Maternidade Bissaya Barreto (MBB), a Maternidade Daniel de Matos (MDM) e outras instituições públicas e privadas, havendo um fluxo de amostras que dentro da instituição é assegurado por um sistema pneumático e entre instituições é efetuado por uma equipa de transporte automóvel.

O Serviço de Patologia Clínica é dirigido pelo Doutor Fernando Rodrigues. O laboratório é composto por uma sala de espera, uma sala de colheitas, uma zona de receção de produtos biológicos, salas de armazenamento de produtos e reagentes, sala de lavagem e esterilização de material, secretaria, sala de reuniões, sala de refeições e ainda por vários setores de processamento de amostras. Os setores dividem-se ainda de acordo com as áreas de Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hematologia, sendo as duas últimas incluídas maioritariamente no *CoreLab*.

Cada uma das áreas é composta por uma equipa multidisciplinar de profissionais de saúde desde médicos patologistas clínicos, farmacêuticos, técnicos superiores de saúde e também técnicos de diagnóstico e terapêutica.

O laboratório funciona com base num sistema informático designado Clinidata (Maxdata) que permite o acesso a informação clínica, bem como ao histórico do doente e aos pedidos efetuados para determinada amostra. É uma mais valia para a validação dos resultados obtidos (diagnóstico, seguimento e controlo).

As amostras chegam à receção do *CoreLab*, são integradas no sistema informático e colocadas numa cadeia de equipamentos que as distribui de acordo com os testes analíticos solicitados pelos clínicos (Anexo A), com exceção das amostras para estudo microbiológico que são entregues no setor. A automatização tem como principal objetivo a diminuição de erros na fase pré-analítica e a rapidez do processo.

O setor da Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica dos CHUC está dividido em quatro subsectores: Bacteriologia, Parasitologia, Micobacteriologia e Micologia. Em conjunto contribuem para uma pesquisa detalhada de microrganismos presentes nas diversas amostras.

Na Bioquímica, as amostras são maioritariamente processadas de forma automatizada na cadeia de equipamentos que constituem o *CoreLab* e onde são determinados parâmetros da bioquímica de rotina e de urgência. As amostras biológicas mais comuns são: soro, plasma e

urina. Neste setor são realizadas sumárias de urina com e sem sedimento e a deteção de sangue oculto nas fezes.

Na Imunologia, o setor utiliza o soro como principal amostra biológica, mas também executa testes a partir de amostras de urina. É composto por dois subsectores: Imunologia que determina parâmetros relacionados com imunidade em geral e alergias e Autoimunidade que pesquisa de autoanticorpos.

O setor da Hematologia é constituído em parte pela cadeia automatizada do *CoreLab* e por salas onde se executam técnicas complementares e outras onde os resultados são validados. Neste setor são determinados parâmetros do hemograma, citologia e coagulação, citogenética, FISH, biologia molecular e citometria de fluxo.

Os resultados emitidos pelo laboratório são atestados com confiança, uma vez que são feitos controlos de qualidade internos diariamente e externos periodicamente sempre que são enviadas amostras pelas entidades UK NEQAS, RIQAS ou EQAS. A avaliação externa permite comparar os resultados do laboratório do CHUC com outros laboratórios que participam nos mesmos programas de controlo de qualidade.

III. Atividades desenvolvidas

I. Microbiologia

O setor da Microbiologia do CHUC está dividido em Bacteriologia, Parasitologia, Micologia e Micobacteriologia. Na sala de receção de amostras é feita integração informática das mesmas. De seguida as amostras são processadas de acordo com os produtos biológicos recebidos e as análises requeridas.

Este setor possui métodos de diagnóstico microbiológico que passam pelo conhecimento da estrutura e morfologia dos microrganismos. Este conhecimento é muito importante para a cultura, caracterização e identificação dos organismos patogénicos após o seu isolamento bem como para o conhecimento da suscetibilidade aos antimicrobianos, que proporciona uma terapêutica direcionada e eficaz. A capacidade que os microrganismos possuem de mudarem rapidamente, adquirirem novos genes e sofrerem mutações apresenta um desafio contínuo para a Microbiologia. (1) A área da Microbiologia depende de várias fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica, como demonstrado na Figura 1.

No diagnóstico de doenças infecciosas há várias etapas importantes que precedem o trabalho laboratorial e que se integram na fase analítica: escolher uma amostra apropriada para examinar, obter a amostra adequadamente para evitar a contaminação da flora normal, transportar a amostra imediatamente para o laboratório ou armazená-la corretamente e fornecer informações essenciais para orientar o pessoal do laboratório. (2)

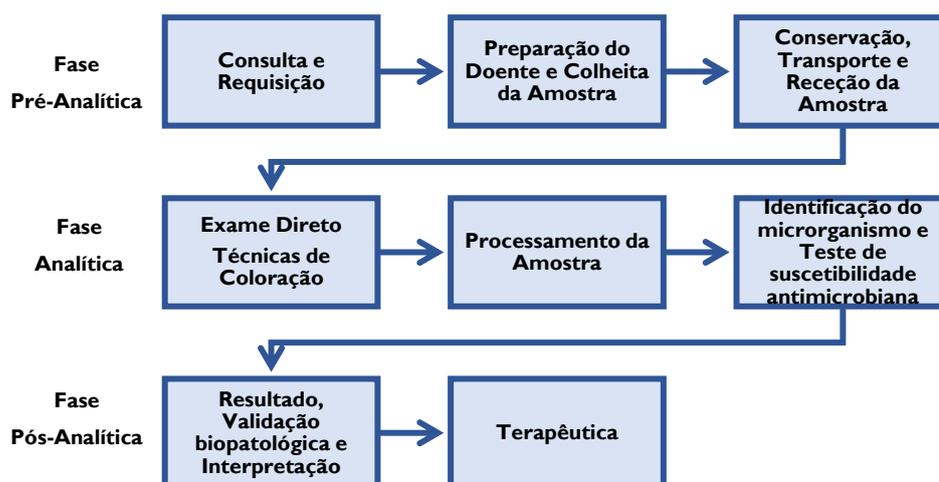


Figura 1 Processo de atividades no Laboratório Clínico de Microbiologia

1.1 Bacteriologia

Bactérias são organismos unicelulares, classificados como procariotas, de tamanho reduzido e com uma estrutura relativamente simples, mas com características individuais que permitem a sua distinção. Da interação entre o corpo humano e as espécies bacterianas, pode resultar uma colonização transitória, uma relação simbiótica a longo prazo ou doença. (3) Os microrganismos da flora normal variam de acordo com o local anatómico, idade, dieta, estado de saúde e higiene pessoal. Já a colonização transitória refere-se à presença de um novo organismo que não causa sintomas.

A doença pode ter origem em dois mecanismos principais: produção de toxinas pelo microrganismo ou invasão de locais anatómicos normalmente estéreis resultando em infeção. (2)

1.1.1. Laboratório de Bacteriologia:

O processo laboratorial na Bacteriologia passa por promover o crescimento, o isolamento, a identificação e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos presentes na amostra e que possam ser causadores de doença.

O crescimento dos microrganismos baseia-se na inoculação de amostra em meios de cultura adequados com o objetivo de obter colónias isoladas. Em simultâneo, é preparado um esfregaço da amostra para observação microscópica que permite a orientação do diagnóstico e da terapêutica empírica.

No laboratório de microbiologia do CHUC, a identificação é geralmente feita num sistema automatizado VITEK MS[®], a partir de colónias isoladas e os testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) são efetuados maioritariamente pelo sistema automatizado VITEK 2[®]. Para alguns microrganismos para os quais o sistema automático não está validado, é efetuado o teste de suscetibilidade manual.

1.1.1.1. Diagnóstico Laboratorial:

A identificação de um microrganismo exige a realização de determinados procedimentos como: visualizar a sua morfologia ao microscópio ótico após coloração, observar o seu aspeto macroscópico em cultura e realizar provas específicas de identificação. (2)

I. Exame Direto:

O exame microscópico fornece informações rapidamente e às vezes é suficiente para fazer uma identificação presuntiva do microrganismo. Características como o tamanho, forma e reação tintorial, podem fornecer informações sugestivas sobre a identidade do organismo.

(4) É um exame com grande importância clínica porque pode direcionar os procedimentos seguintes e orientar a terapêutica empírica.

As técnicas de coloração aplicadas permitem a distinção do tipo de bactérias em função da composição química das paredes celulares tal como está descrito na Tabela 2. (5)

Tabela 1 Agrupamentos e formas bacterianas.

Cocos		Bacilos		Espiral	
	Diplococos		Diplobacilos		Vibrio
	Estreptococos				Espirilha
	Estafilococos		Estreptobacilos		Espiroqueta
	Tetrada				

Tabela 2 Métodos diretos. Princípios e aplicações.

Método	Princípios e Aplicações
	Exame a fresco
Exame Direto	Coloca-se uma gota de soro fisiológico numa lâmina e faz-se a suspensão da amostra na solução, cobre-se com uma lamela e observa-se ao microscópio com objetiva de 40x. Este método simples permite apreciar a presença de bactérias e fungos e fazer a sua distinção quando não é possível fazê-lo através das características morfológicas da cultura. (7)
	Coloração de Gram
Coloração Diferencial	A coloração de Gram utiliza um corante primário, cristal de violeta, um mordente, soluto de lugol, um diferenciador composto por álcool e acetona e um corante secundário, safranina ou fucsina diluída. As bactérias Gram positivo coram de roxo e as Gram negativo de cor-de-rosa. É importante para avaliação morfológica e distinção bacteriana em dois grupos principais (Gram-negativas e Gram-positivas), de acordo com as formas (bacilos, cocos, vibrião, espirila) e tipos de agrupamento (diplo, estafilo, estrepto, tetrada, paliçada). As lâminas coradas são observadas ao microscópio ótico com a objetiva de imersão. É uma técnica muito útil na orientação do diagnóstico e administração de uma terapia empírica. (Figura 2.) (8)
	Coloração de Ziehl- Neelsen modificada
Coloração para deteção de Resistência Ácido-Álcool	A coloração de Ziehl-Neelsen modificada utiliza uma solução de fucsina que atravessa a parede celular (fucsina, fenol, álcool e água destilada), uma solução descorante composta por álcool etílico e ácido clorídrico concentrado e um segundo corante azul de metileno. As bactérias ácido-álcool resistentes retêm o primeiro corante e ficam vermelhas. As bactérias que não são resistentes coram de azul. É uma técnica que permite a distinção de micobactérias das restantes bactérias. As lâminas são observadas ao microscópio ótico com a objetiva de imersão. (8)

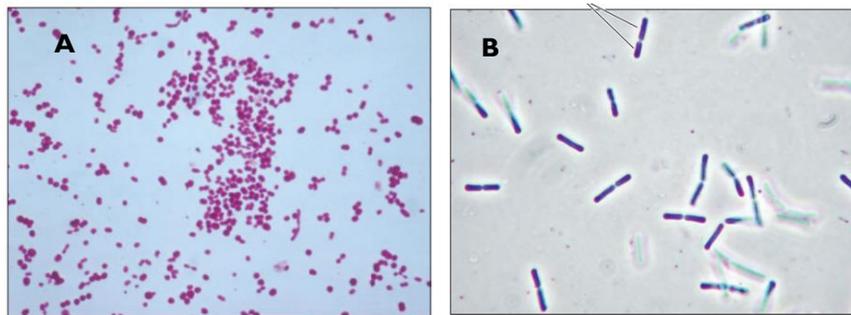


Figura 2 Imagens de bactérias obtidas ao microscópio óptico após coloração de Gram. A. Cocos Gram-positivo
B. Bacilos Gram-negativo (Figuras adaptadas de Cappuccino, James G.)

II. Cultura:

A cultura de bactérias a partir de uma amostra biológica tem como objetivo: o crescimento e isolamento de todas as bactérias presentes, a determinação das bactérias que são potencialmente a causa da infecção e as que provavelmente são contaminantes ou colonizadores e ainda obter o crescimento de bactérias clinicamente relevantes para proceder aos testes de identificação, de caracterização e de suscetibilidade. (9)

Diferentes bactérias têm diferentes necessidades nutricionais, daí a necessidade de adequar os meios de cultura aos requisitos de cada célula bacteriana.

Os meios de cultura podem ser catalogados em: meios enriquecidos não seletivos, meios seletivos e meios diferenciais. Podem ainda ser classificados com base na percentagem de agar em: líquidos, semi-sólidos ou sólidos. (3)

Meios de enriquecimento não seletivos

São meios que permitem o crescimento da maioria dos organismos sem necessitarem de requerimento nutricional adicional. (Tabela 3) (3)

Meios seletivos

Meios utilizados para o isolamento de organismos específicos que podem estar presentes em conjunto com outros organismos. Os meios são suplementados com substâncias que inibem o crescimento de organismos indesejados. Alguns meios seletivos podem também ser diferenciais. (Tabela 4) (3)

Meios diferenciais

Os meios são classificados como diferenciais quando há adição de ingredientes específicos que permitem a diferenciação de organismos estritamente relacionados. (Tabela 4) (3)

Tabela 3 Meios de enriquecimento utilizados no laboratório de bacteriologia

Estado	Meios de Enriquecimento e Aplicações
Sólido (1,5% agar)	<p align="center">Gelose Sangue</p>
	<p>Meio de enriquecimento não seletivo. Constituído por dois componentes principais: um meio básico (p. ex tripticase de soja) e o sangue (p. ex., de ovelha, cavalo ou coelho). (3) É um meio de cultura útil para multiplicação, isolamento ou identificação de bactérias. (7)</p>
	<p align="center">Gelose de Chocolate</p>
	<p>Meio enriquecido, não seletivo obtido a partir da gelose sangue, pelo aquecimento da mistura com sangue a 80°C o que provoca a hemólise dos eritrócitos e confere a tonalidade acastanhada. (7) Contém uma base de agar, tampão fosfato, amido de milho que neutraliza os ácidos gordos e hemoglobina bovina que fornece fator X (hemina) para espécies de <i>Haemophilus</i>. O enriquecimento IsoVitaleX é um suplemento que fornece fator V (nicotinamida adenina dinucleotídeo, NAD), vitaminas, aminoácidos, co-enzimas, dextrose, iões férricos e outros fatores que melhoram o crescimento de <i>Neisseria</i>. (10)</p>
	<p align="center">Gelose de Chocolate com Piridoxal (PVX)</p>
	<p>O PVX é um meio de gelose chocolate enriquecido com Piridoxal que é um composto de vitamina B6 necessário para o crescimento de <i>Streptococcus</i> nutricionalmente variáveis, bem como <i>Haemophilus</i> e outras bactérias exigentes. (10)</p>
	<p align="center">Meio de Mueller-Hinton (MH)</p>
	<p>Meio não seletivo, recomendado para a realização dos testes de suscetibilidade bacterianos de rotina. Apresenta uma composição bem definida de extratos de caseína e carne, sais, catiões divalentes e amido solúvel necessário para que haja reprodutibilidade dos resultados. (3)</p>
	<p align="center">Meio de Trypticase de Soja</p>
	<p>Meio não seletivo utilizado para o controlo dos antibiogramas manuais e automatizados. (10)</p>
Líquido	<p align="center">Brain Heart Infusion (BHI)</p>
	<p>Meio líquido de enriquecimento ou meio base para hemoculturas, geralmente usado no cultivo de microrganismos exigentes e não exigentes, incluindo bactérias aeróbias e anaeróbias. (10)</p>
	<p align="center">Caldo Cooked Meat (CM)</p>
	<p>Meio utilizado para a identificação de anaeróbios uma vez que a proteína muscular do tecido cardíaco é uma fonte de aminoácidos e outros nutrientes utilizados pelos microrganismos anaeróbios que crescem mesmo que presentes em pequeno número numa amostra. (10)</p>
	<p align="center">Meio de Cultura BacT/ALERT® FAN® Plus</p>
	<p>Meio de cultura complexo suplementado, com sensor de emulsão líquida sensível ao pH. O sangue é inoculado no meio e colocado no BACT/ALERT®3D. Os sensores de emulsão líquida mudam visivelmente de cor quando o pH se altera devido ao aumento de CO₂, à medida que é produzido pelos microrganismos. Garante a deteção precisa e a recuperação rápida de microrganismos a partir de vários tipos de amostra.</p>

Tabela 4 Meios seletivos e diferenciais utilizados no laboratório de bacteriologia

Estado	Meios Seletivos e Diferenciais e Aplicações
Sólido (1,5% agar)	<p align="center">Meio de Cistina, Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED)</p>
	<p>Meio diferencial, utilizado para cultura de amostras de urina. Permite o isolamento dos agentes patogênicos mais frequentes de infecção urinária e a identificação presuntiva das colônias. (7) A lactose funciona como fonte de energia para organismos fermentadores produtores de ácido com consequente diminuição do pH e alteração da cor do meio de verde para amarelo. A cistina aumenta o crescimento de coliformes “colônia anã” por exclusão da sacarose. A deficiência de eletrólitos restringe o “swarming” de espécies de <i>Proteus spp.</i> (10)</p>
	<p align="center">Gelose Chocolate com Bacitracina (HAE)</p>
	<p>Meio obtido a partir da gelose chocolate com adição de bacitracina que favorece o crescimento de <i>Haemophilus spp</i> nos produtos com flora mista devido à inibição das bactérias gram-positivas e à maioria das espécies de <i>Neisseria</i>. (7) A bacitracina é utilizada como agente seletivo para aumentar a recuperação de espécies de <i>Haemophilus</i> do trato respiratório. (10)</p>
	<p align="center">Meio para Neisseria</p>
	<p>Meio seletivo suplementado que se obtém da gelose chocolate com adição de vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim (VCAT) e que permite o isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> em amostras com flora indígena. (7) A colistina inibe bactérias gram-negativas, a vancomicina inibe os contaminantes gram-positivos, a anfotericina inibe o crescimento de <i>Candida albicans</i> e o trimetoprim suprime o “swarming” de espécies de <i>Proteus</i>. (10)</p>
	<p align="center">Meio para Campylobacter</p>
<p>Meio usado para o isolamento e cultura primária de <i>Campylobacter spp.</i> a partir de amostras fecais humanas. Contém componentes específicos para as suas exigências nutricionais. As peptonas fornecem compostos nitrogenados, carbono, enxofre e ingredientes vestigiais. O extrato de levedura é uma fonte das vitaminas do complexo B. Dextrose é utilizada como fonte de energia. O sangue de ovelha fornece nutrientes adicionais. A incorporação de anfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprim e vancomicina suprime o crescimento da flora microbiana normal em amostras fecais, facilitando o isolamento. A vancomicina inibe bactérias gram-positivas, a polimixina B inibe a maioria dos bacilos gram-negativos, exceto <i>Proteus</i> e trimetoprim é inibitório para <i>Proteus spp.</i> (10)</p>	
<p align="center">Meio para Salmonella e Shigella (SS)</p>	
<p>Meio seletivo e diferencial de isolamento para <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> (7) Inibe os microrganismos gram-positivos e permite a diferenciação de organismos entéricos de não entéricos pela incorporação de lactose no meio. Organismos que fermentam lactose produzem ácido e formação de colônias vermelhas. Os não fermentadores de lactose formam colônias incolores como é o caso da <i>Salmonella</i> e da <i>Shigella</i>. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a detecção da produção de sulfureto de hidrogênio, o que dá origem a colônias com centros negros. (10)</p>	
<p align="center">Meio de Hektoen</p>	
<p>Meio seletivo e diferencial para o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> Os sais biliares inibem as bactérias gram-positivas e atrasam o crescimento de algumas <i>Enterobacteriaceae</i>. (7) Este meio contém lactose, sacarose e salicina, para diferenciação dos agentes patogênicos pela cor das colônias e do meio adjacente destas. O citrato de ferro amoniacal e o tiosulfato de sódio permitem a detecção da produção de sulfureto de hidrogênio e auxiliam no processo de diferenciação entre espécies por produção de colônias concentradas em preto. (10)</p>	
<p align="center">Meio para Yersinia (CIN)</p>	
<p>Meio suplementado com cefsulodina e novobiocina é um meio diferencial e seletivo usado para o isolamento de <i>Yersinia spp.</i> A fermentação do manitol na presença de vermelho neutro resulta em colônias características “bull’s eye”, incolor com centro vermelho. A inibição seletiva de organismos gram-negativos e gram-positivos é obtida pelo violeta de cristal, desoxicolato de sódio e Irgasan. A suplementação com cefsulodina e novobiocina melhora a inibição de organismos da flora gastrointestinal normais. Organismos que não metabolizam manitol em produtos finais ácidos formam colônias translúcidas e incolores. (10)</p>	

	<p align="center">Gelose sangue, Colistina e Acido Nalidíxico (CNA)</p> <p>Meio seletivo e diferencial com colistina e o ácido nalidíxico que inibem as <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Pseudomonas spp.</i> Prioriza o crescimento de bactérias gram-positivas, contudo algumas bactérias gram-negativas como <i>Gardnerella vaginalis</i> e alguns <i>Bacteroides spp.</i> também se desenvolvem. (7)</p>
	<p align="center">Meio de Schaedler</p> <p>O meio de Schaedler KV com sangue de ovelha a 5%, contendo canamicina e vancomicina, é especialmente útil no isolamento seletivo de anaeróbios gram-negativos como <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i>. Permite o crescimento de microrganismos anaeróbios exigentes, como lactobacilos, estreptococos, <i>Clostridium</i> e <i>Bacteroides</i>. A inclusão da vitamina K é um requisito de crescimento para algumas espécies de <i>Prevotella melaninogenica</i> e é relatado como potencializador do crescimento de algumas espécies de <i>Bacteroides</i> e não-formadores de esporos gram-positivos. A canamicina inibe a síntese de proteínas em organismos suscetíveis, enquanto a Vancomicina inibe bactérias gram-positivas por interferir na síntese da parede celular. O tipo de organismo recuperado depende do ambiente utilizado no processo de incubação (aeróbico, aeróbico suplementado com dióxido de carbono ou condições anaeróbicas). (10)</p>
	<p align="center">Meio de Tioglicolato (HK)</p> <p>Meio enriquecido utilizado para cultura de microrganismos anaeróbios. A vitamina K1 é um requisito de crescimento para algumas espécies de <i>Prevotella</i>, de <i>Bacteroides</i> e de microrganismos não-formadores de Gram-positivos. A hemina é a fonte do fator X, que estimula o crescimento de muitos microrganismos. O carbonato de cálcio neutraliza os ácidos produzidos durante o crescimento e mantém a viabilidade de organismos exigentes como <i>Clostridium perfringens</i> e outras bactérias sensíveis ao ácido. (10)</p>
Líquido	<p align="center">Caldo Bacilo Gram Negativo (CBGN)</p> <p>Meio líquido de enriquecimento para <i>Enterobacteriaceae</i>, especialmente <i>Shigella spp</i> e <i>Salmonella spp.</i> O manitol promove seletivamente o crescimento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> que o metabolizam. O citrato e o desoxicolato atuam como agentes selectivos e inibem o crescimento da maioria das <i>Enterobacteriaceae</i> da flora indígena habitual do intestino e todos os tipos de bacilos formadores de esporos. A subcultura para meio sólido deve ocorrer entre as 6 e 12 horas, pois esse é o prazo médio de inibição de outras estirpes, tal como o <i>Proteus spp.</i> (7)</p>

i. Técnicas de sementeira

A técnica de sementeira aplicada varia com a amostra e com o objetivo final. Os meios devem ter uma superfície seca e sem gotículas de condensação na tampa. A sementeira é feita maioritariamente em meio sólido em placa por espalhamento com ansa ou zaragatoa com o objetivo de obter colónias isoladas (Figura 3A), no entanto há exceções. No caso da urina a inoculação é feita com auxílio de uma ansa calibrada (de 10 µL) e deve permitir a quantificação de colónias (Figura 3B). Outras amostras como o líquido cefalorraquídeo (LCR) exigem uma inoculação por inundação, uma vez que os microrganismos estão presentes em baixas concentrações. Os cateteres são processados diretamente no meio sólido e a inoculação faz-se por rolamento. Relativamente aos meios líquidos, a inoculação é feita por adição direta de amostra ao meio, seguido de uma homogeneização por inversão (Figura 3C). (1,7)

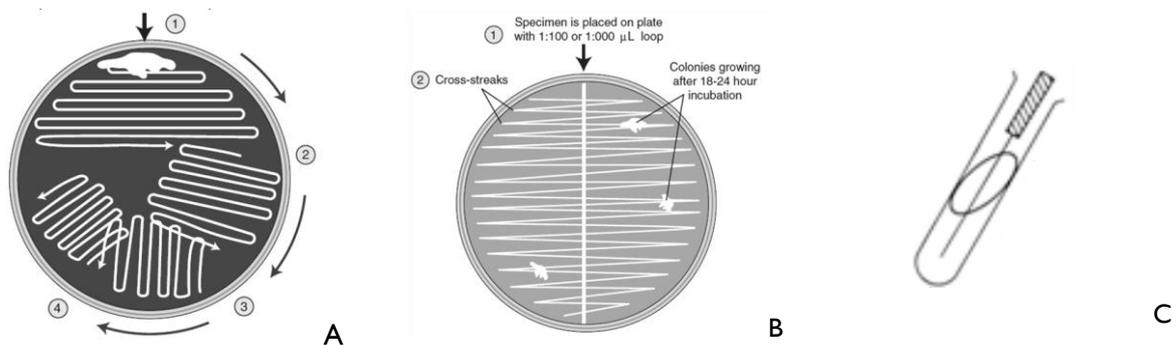


Figura 3 A. Sementeira por esgotamento em meio sólido; B. Sementeira quantitativa em meio sólido com ansa calibrada de 1 µL; (Figuras adaptadas de Mahon, Connie). C. Sementeira por dispersão em meio líquido (Figura adaptada de Fonseca et al)

ii. Condições de incubação das culturas

Para que o crescimento de bactérias clinicamente relevantes seja mais eficaz é necessário otimizar as condições ambientais. Os fatores ambientais mais críticos a serem tidos em conta na cultura *in vitro* incluem: a disponibilidade de oxigénio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂), temperatura, pH e humidade do meio.

Quanto à utilização de oxigénio as bactérias dividem-se em aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias estritas. Grande parte dos organismos aeróbios, clinicamente relevantes, são na verdade anaeróbios facultativos. Algumas bactérias como *Pseudomonas spp.*, membros da família *Neisseriaceae*, *Brucella spp.*, *Bordetella spp.* e *Francisella spp.*, são estritamente aeróbias e não crescem na ausência de oxigénio. Outras bactérias requerem apenas baixos níveis deste gás e são chamadas de microaerofílicas. (9)

As bactérias anaeróbias são incapazes de usar o oxigénio, mas algumas espécies aerotolerantes podem crescer lenta e pobremente na presença de oxigénio. Para as restantes bactérias estritamente anaeróbias, o oxigénio é inibitório ou letal. Além do oxigénio, a disponibilidade de CO₂ é importante para o crescimento de certas bactérias. Para algumas bactérias, uma concentração de 5% a 10% de CO₂ é essencial para o sucesso da cultura. (9)

No que respeita aos valores da temperatura, os agentes patogénicos multiplicam-se melhor a temperaturas semelhantes às dos tecidos e órgãos corporais. A maioria das bactérias tem um bom desenvolvimento a temperaturas na faixa dos 35-37°C. Para outras, pode ser mais favorável uma temperatura de 30°C ou até de 42°C como é o caso de *Campylobacter spp.* (9)

Relativamente ao pH, o ideal é entre os 6,5 e os 7,5 que correspondem a uma gama quase neutra de valores. Normalmente os meios de cultura já são comercializados com o pH nessa faixa de valores. (9)

O controlo da humidade é um parâmetro essencial para o crescimento das bactérias em cultura. A água é o principal constituinte dos meios e é utilizada pelos microrganismos para manter ativas as vias metabólicas essenciais e também para controlar a concentração de soluto de modo a evitar o choque osmótico e conseqüentemente a lise celular. (9)

III. Identificação:

A identificação dos agentes patogénicos inicia-se com a interpretação das culturas primárias após 18-24h de incubação. A interpretação do crescimento bacteriano em meios seletivos, diferenciais ou enriquecidos fornece resultados que possibilitam maior rapidez e adequação do tratamento ao doente. É efetuada uma correlação entre o crescimento do organismo nos meios de cultura e os resultados anteriormente obtidos no exame direto ou na coloração de Gram. (9)

Aspeto macroscópico das colónias

Para caracterizar a morfologia das colónias avaliam-se parâmetros como: tamanho; cor; forma, elevação e margem; aparência da superfície (brilhante, opaca, seca, transparente); alterações nos meios de cultura como resultado do crescimento bacteriano (padrão hemolítico; alterações na cor dos indicadores de pH) (Figura 5); (9)

No entanto não é aconselhável colocar total confiança na morfologia da colónia para identificação preliminar uma vez que bactérias da mesma espécie exibem diversidade morfológica. (1) (Figura 4)

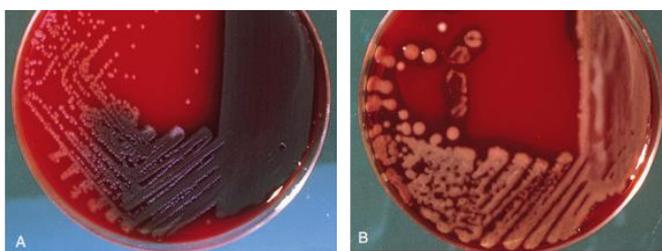


Figura 4 A, *Pseudomonas aeruginosa* com brilho metálico e pigmentação verde das colónias em gelose sangue. B, Espécie mucosa de *Pseudomonas aeruginosa* na GS. (Figuras adaptadas de Mahon, Connie)

O crescimento dos organismos em meios líquidos (como BHI, CBGN e CM) é avaliado com base na turbidez, produção de gás ou espuma e crescimento à superfície ou na área microaerófilas. (1) (Figura 6)

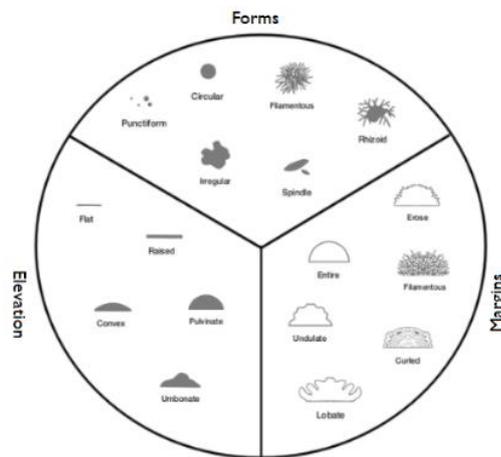


Figura 5 Aspeto das colónias em meio sólido (Figura adaptada de Cappuccino, James G)

i. Métodos de identificação utilizados no laboratório de bacteriologia

Os métodos de identificação baseiam-se nas características fenotípicas das bactérias, no uso de métodos químicos moleculares ou métodos avançados como MALDI-TOF. Estes métodos são cada vez mais automatizados e simples por forma a diminuir o tempo de resposta. (9)

VITEK® MS

O VITEK® MS é um sistema automatizado de identificação microbiana por espectrometria de massa que utiliza uma tecnologia MALDI-TOF-*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*. A identificação é feita rapidamente a partir de colónias isoladas e proporciona o conhecimento do microrganismo ao nível de género e espécie.

Este sistema possui um algoritmo que lê cada espectro como uma série de picos que são analisados pela massa e pela intensidade e comparados com uma base de dados. (11)

Uma pequena quantidade de amostra é aplicada no slide em contacto com uma matriz química que permite a extração de proteínas dos microrganismos. A solução é deixada secar e o resultado é a cristalização das proteínas da amostra. Ao introduzir o slide no sistema, é aplicado um laser UV à estrutura cristalizada. Esta ação permite a absorção de energia e transferência de calor para as proteínas da amostra que ficam com carga positiva num processo de dessorção/ionização. As proteínas ionizadas são separadas num tubo de voo. Quanto mais leves forem os iões, mais rápido eles percorrem o tubo (menor tempo de voo). A separação dos iões é feita pela sua relação massa/carga e é medida por um detetor.

Cada proteína gera um sinal distinto e todos os microrganismos possuem um conjunto espectral único. (1)

A técnica é limitada à base de dados e à identificação de organismos a partir de um isolamento puro. (9)

GeneXpert®

O GeneXpert® é um dispositivo que integra o processamento automatizado de amostras e a detecção por PCR em tempo real de agentes infecciosos. (12) É uma técnica de biologia molecular de fácil execução, elevada sensibilidade e especificidade, com capacidade de analisar o DNA de amostras celulares/biológicas. (5)

A extração, amplificação e detecção são realizadas integralmente num cartucho descartável que contém os reagentes liofilizados para pesquisa de organismos específicos e onde é colocada a amostra que vai ser analisada.

O laboratório de bacteriologia do CHUC possui o GeneXpert® XVI e reagentes para a pesquisa da toxina do *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, e detecção de Carbapenemases.

Ao mesmo tempo que identifica sequências específicas de genes característicos de determinada bactéria, também pode verificar a resistência a antibióticos por meio de mutações genéticas. (13)

Uma desvantagem é que este método não apresenta bom desempenho no caso de infecções polimicrobianas, e há alguma ambiguidade na identificação de certos grupos de organismos. (1)

Accelerate Pheno™

Accelerate Pheno é um sistema que utiliza uma tecnologia de hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) totalmente automatizada para uma rápida identificação genómica dos agentes infecciosos.

FISH é uma técnica com elevada especificidade que identifica e quantifica microrganismos. Utiliza uma sonda de ácido nucleico (DNA ou RNA) complementar a uma sequência de um gene alvo e provoca a hibridização. As sondas podem ser fluorescentes se lhes for adicionado um corante e são usadas para identificar organismos que contêm uma sequência de ácido nucleico complementar à sua. (14)

Após se obter a identificação, o sistema fornece interpretações (suscetível, intermediária ou resistente) dos testes de suscetibilidade antimicrobiana com base nos critérios do EUCAST. É de fácil manuseamento e a rapidez dos resultados fornece ao médico orientações oportunas para a administração de terapia empírica ou otimização da terapia definitiva. (15)

IV. Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA)

O teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) é realizado para determinar a antibioterapia eficaz no tratamento de infeções causadas pelos organismos previamente identificados nas amostras biológicas. Frequentemente, estes organismos identificados precisam de ser diferenciados da microbiota normal que pode residir no local da infeção, embora nalgumas situações a microbiota que reside no local da infeção possa contribuir para a infeção. (1)

Com o aumento da resistência bacteriana a múltiplos fármacos, os testes de suscetibilidade antimicrobiana são fundamentais para fornecer as informações corretas para respostas clínicas específicas e melhores resultados de assistência ao doente.

A realização e interpretação dos resultados são feitas com base nas normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* ou no *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* para antibióticos não descritos no EUCAST.

VITEK 2®

VITEK 2® é um equipamento concebido para realizar testes de identificação microbiológica e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos de forma rápida e precisa. (16)

É baseado num sistema de cartas que contêm nos seus poços os antibióticos de concentração conhecida que vão ser testados para o grupo de bactérias correspondente. O teste é feito a partir de uma suspensão bacteriana de 0,5 McFarland que é posta em contacto com os antibióticos. Após a incubação, é lida a densidade dos poços para avaliar o crescimento bacteriano por turbidimetria. É disponibilizada a CMI e a sua interpretação.

Para controlar a pureza da suspensão é efetuada simultaneamente uma inoculação em meio de tripticase de soja com ou sem suplemento.

O controlo do equipamento é feito com bactérias ATCC (*American Type Culture Collection*) com um perfil de suscetibilidades conhecidas. O teste de suscetibilidade a antimicrobianos deve ser realizado a partir de meios validados pela casa comercial. (16)

Tabela 5 Cartas de Suscetibilidade Antimicrobiana usadas no VITEK® 2

Cartas de Suscetibilidade Antimicrobiana usadas no VITEK® 2	
AST 619	Carta utilizada para <i>Staphylococcus spp</i>
AST 586	Carta utilizada para <i>Streptococcus spp</i> e <i>Enterococcus spp</i>
AST 192	Carta utilizada para Enterobactérias
AST 222	Carta utilizada para Não -Enterobactérias

TSA manual

No laboratório de bacteriologia, é realizado o TSA manual para bactérias para as quais não está definido o antibiograma automático através do método de difusão em discos de teste pelo método de Kirby-Bauer ou por tiras E-test. Geralmente é efetuado em meio de Muller-Hinton (MH) para o crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias. No caso de bactérias fastidiosas como *Haemophilus influenzae* é feito num meio enriquecido (MH suplementado com sangue). Para a realização do inóculo, prepara-se uma suspensão bacteriana, a partir de uma cultura pura, com uma turbidez de 0,5 McFarland. A inoculação é feita pela técnica de sementeira em toalha para que o crescimento das bactérias seja homogêneo. As placas são incubadas a 37°C, em atmosfera de aerobiose, durante 24 horas.

Difusão em discos de teste pelo método de Kirby-Bauer: Os discos de papel impregnados com antibiótico são colocados no meio previamente inoculado com a suspensão bacteriana. Os antibióticos difundem-se radialmente e produzem um gradiente de concentração que vai diminuindo à medida que a distância aos discos aumenta. (5) Após incubação, os diâmetros das zonas produzidas pela inibição antimicrobiana do crescimento bacteriano são medidos e o resultado é interpretado de acordo com os critérios predefinidos pelo EUCAST como suscetível, intermediário ou resistente. (1)

Tiras E-test: Após inoculação da suspensão bacteriana em toda a superfície do meio, são colocadas as tiras E-test impregnadas de antibiótico, à superfície. Cada tira contém um gradiente de antibiótico e possui uma escala de valores de concentrações mínimas inibitórias em µg/ml que dão origem a uma zona elíptica de inibição. As CMI são medidas a partir do ponto de interseção entre a zona de inibição e a escala dos valores da tira. (5)

1.1.1.2. Amostras:

I. Urina

As infeções do trato urinário (UTI's) ocorrem em dois contextos: adquiridas na comunidade, que são as mais comuns e adquiridas em meio hospitalar (nosocomiais), que contribuem significativamente para as taxas de infeções adquiridas em hospitais. (17) A fase pré-analítica é dependente da colheita da amostra que deve ser efetuada pela manhã, sempre que for possível. Após higienização da zona genital, a primeira porção do jato urinário é desperdiçada e a recolha do jato intermédio é feita diretamente para um tubo esterilizado e posteriormente transferida para um tubo com ácido bórico, de forma a preservar as características da amostra. (7) As mulheres são mais propensas à infeção do que os homens e também apresentam maior dificuldade na colheita adequada das amostras. A partir de uma certa idade, a incidência das infeções urinárias nos homens aumenta.

Os locais mais comuns de infeção do trato urinário são a bexiga (cistite) e a uretra (uretrite). A partir desses locais, a infeção pode ascender aos ureteres e conseqüentemente envolver o rim (pielonefrite). No caso dos homens, as infeções podem atingir a próstata (prostatite). As UTI podem ser assintomáticas, agudas ou crónicas e o seu diagnóstico é feito por cultura *in vitro* e com base na história clínica do doente.

Tabela 6 Processamento da amostra de urina

Exame microscópico		Não aplicável
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose Sangue CLED
	Processamento	Ansa calibrada de 1 µL
	Incubação	18 a 24h a 37°C em anaerobiose

As colónias bacterianas podem ser interpretadas quantitativamente a partir da cultura. Assim, inferior a 10 colónias corresponde a $<10^4$ UFC/mL, 10-100 colónias correspondem a 10^4 - 10^5 UFC/mL, e >100 colónias correspondem a $>10^5$ UFC/mL. (Figura 6)

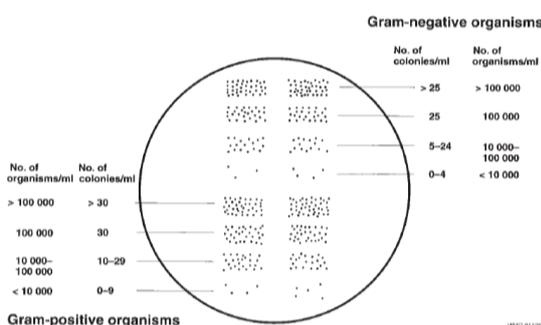


Figura 6 Interpretação quantitativa das colónias bacterianas (Adaptado de Vandepitte, J)

A valorização da contagem é feita de acordo com a Tabela 7.

Uma quantidade inferior a 10^4 UFC/mL representa ausência de UTI. Em casos excepcionais de colheitas feitas diretamente da bexiga por punção suprapúbica ou cistoscopia, em mulheres sintomáticas de acordo com a história clínica ou na

presença de leucocitose, faz-se a identificação da bactéria e o resultado do teste de suscetibilidade.

Na faixa de valores entre 10^4 e 10^5 UFC/mL, podemos estar perante uma UTI e devem também ser analisados sintomas de acordo com a história clínica e a possível presença de leucocitúria. Se houver dúvida na contagem, na qualidade da amostra de urina ou no significado dos sintomas do doente, deve ser pedida a colheita de nova amostra.

Mais de 10^5 UFC/mL, são feitos os testes de identificação e suscetibilidade. Essas contagens bacterianas são fortemente sugestivas de UTI em todos os doentes.

A presença de duas ou mais espécies de bactérias nas amostras de urina são provavelmente contaminação, deve ser colhida nova amostra. (18)

Tabela 7 Valorização da contagem de colónias bacterianas e continuação do procedimento de identificação

	Quantidade de colónias	Resultado e Procedimento
Sem crescimento ao fim de 18 a 24h	0 colónias	Negativo
Crescimento de $\geq 10^5$ UFC	1 tipo de colónia	Identificação e TSA
	2 tipos de colónias	Repicagem para CLED se bacilo Gram-negativo; Repicagem para GS se coco Gram-positivo
	> 2 tipos de colónias	Presença de flora mista/contaminação; Rejeita-se a amostra e sugere-se nova colheita.
Crescimento entre 10^4 e 10^5 UFC	1 tipo de colónia	Identificação e TSA
	> 2 tipos de colónias	Presença de flora mista/contaminação; Rejeita-se a amostra e sugere-se nova colheita.
Crescimento $< 10^4$ UFC	1 tipo de colónia	A identificação e o TSA efetuam-se de acordo com a história clínica do doente

As Enterobacteriaceae são a causa mais comum de infeções do trato urinário em crianças e adultos, com grande destaque para a bactéria *Escherichia coli*. Outros membros deste grupo de bactérias estão também implicados como *Proteus mirabilis*, frequentemente associado a cálculos urinários. Bactérias como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* são frequentemente encontradas nas UTI complicadas, adquiridas em meio hospitalar. Entre as bactérias Gram-positivas, o *Staphylococcus saprophyticus* tem uma propensão particular em causar infeção, especialmente nas mulheres jovens sexualmente ativas. Outras espécies que podem ser encontradas: são *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*. (17)

O aparecimento de fungos é comum sobretudo em doentes que estão sob terapêutica antibiótica e associado ao cateterismo. (7)

II. Fezes

Infeções do trato gastrointestinal podem ter origem em diversos agentes patogênicos como bactérias, vírus ou parasitas. A microbiota intestinal é diversa e por isso as amostras são ricas em microrganismos. O sintoma clínico mais comum deste tipo de infecções é a diarreia e a sua causa pode ser determinada pela história clínica, histórico de viagens recentes, exame físico e análise laboratorial de uma amostra fecal. (1) A principal forma de transmissão ocorre pela via fecal-oral, através de alimentos ou águas contaminadas. A doença ocorre como consequência da multiplicação dos agentes infecciosos e/ou produção de toxinas que podem invadir a mucosa intestinal ou a corrente sanguínea. (17)

As bactérias que mais frequentemente causam diarreia são: *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli* (sobretudo a enterohemorrágica), *Yersinia enterocolitica*. Em situações menos frequentes pode ser detetado *Clostridium difficile*. (17)

No laboratório de bacteriologia, o exame às fezes envolve o exame macroscópico e a coprocultura que é efetuada em vários meios seletivos que cumprem requisitos nutricionais específicos, o isolamento de colónias puras e a identificação do patógeno causador de doença (Tabela 8).

Tabela 8 Processamento da amostra de fezes

Exame macroscópico	Observar o aspeto e consistência da amostra (fezes diarreicas ou moldadas; sanguinolentas, com muco ou aquosas)	
Exame microscópico	Não aplicável	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose SS; Gelose HK; Gelose <i>Campylobacter</i> ; Gelose <i>Yersinia</i> ; CBGN
	Processamento	Sementeira por esgotamento Sementeira por dispersão
	Incubação	Os meios SS, HK, <i>Yersinia</i> e CBGN são incubados 18 a 24h a 37°C em aerobiose. O meio <i>Campylobacter</i> é incubado em atmosfera microaerofílica 48 a 72h a 42°C.

III. Sangue

Bacteriémia corresponde à presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea, detetadas por crescimento na hemocultura. (1) A bacteriémia pode resultar em septicémia como consequência de um patógeno circulante ou da produção de endotoxinas. Em casos mais graves, o fluxo sanguíneo é insuficiente para manter o bom funcionamento dos órgãos vitais e dá-se o choque séptico. (4)

A maioria das doenças infecciosas podem decorrer com bacteriemia transitória, intermitente ou persistente. Como o sangue é um produto estéril, o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção. (7) No entanto hemoculturas positivas nem sempre correspondem a infecção, podem ser falsos-positivos resultantes da contaminação por comensais da pele como *Staphylococcus coagulase-negativa* (StaNeg), durante a colheita.

Relativamente ao local de origem da infecção, a classificação da bacteriemia divide-se em: primária (bactérias presentes numa fonte endovascular como um catéter), secundária (quando o microrganismo provém de uma fonte extravascular infetada) ou de origem desconhecida. O local de aquisição da infecção interfere com os microrganismos causadores de infecção. Grande parte da bacteriemia adquirida na comunidade é provocada por *S. pneumoniae*. A bacteriemia nosocomial é normalmente causada por organismos resistentes a medicamentos que expressam β -lactamases ou outros fatores de resistência que impedem a ação de agentes antimicrobianos de primeira linha, daí a importância da execução do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. (1)

A colheita do sangue para hemocultura é efetuada por punção venosa de qualquer das veias periféricas numa zona da pele limpa. São colhidas duas a três amostras de sangue em locais anatómicos diferentes para garrafas de hemocultura diferentes já que uma só hemocultura pode levar a que uma bacteriemia intermitente não seja diagnosticada. O volume de sangue é crítico porque a concentração de microrganismos no sangue é baixa. Geralmente nos adultos, o volume recomendado são 10 a 30 mL e nas crianças, como a concentração de microrganismos é maior, são colhidos 1 a 5 mL. (7) É fundamental que o sangue não esteja coagulado e por isso a colheita deve ser feita diretamente para frascos de hemocultura ou para tubos com anticoagulante (SPS, polietilsulfonato de sódio). As garrafas de hemocultura são colocadas no BACT/ALERT® 3D que é um sistema automático de deteção microbiana que utiliza uma tecnologia colorimétrica. Cada frasco de hemocultura possui membranas sensíveis ao pH, que mudam visivelmente de cor de cinza para amarelo torrado quando há alteração devido ao aumento do CO₂ produzido pelo microrganismo. O sistema mede a cor com frequência para que a deteção seja precoce e precisa. (19)

Quando o equipamento deteta positividade numa hemocultura, é necessário realizar um exame microscópico pela coloração de Gram e uma subcultura em meio sólido, geralmente em gelose com sangue. A incubação é feita em atmosfera de aerobiose, com 5% CO₂ ou em anaerobiose a 35°C durante 24h a 48h, consoante o microrganismo a pesquisar. A leitura

macroscópica das culturas e realização da identificação e testes de sensibilidade são fundamentais. (7)

Tabela 9 Processamento aplicado às hemoculturas introduzidas no BACT/ALERT 3D

Hemocultura negativa ao fim de 5 dias de incubação	Rejeitar a amostra		
Hemocultura positiva ao longo de 5 dias de incubação	Exame microscópico		
	Exame cultural	Meio de cultura	Gelose sangue
		Processamento	Sementeira por esgotamento
		Incubação	24 a 48h a 37°C

Tabela 10 Procedimento aplicado às hemoculturas positivas

Cultura negativa	Repicagem para PVX da garrafa de hemocultura e incubar novamente 24 a 48h a 37°C	
Cultura positiva	1 tipo de colónia	Identificação e TSA
	1 tipo de colónia do tipo StaNeg	Identificação se a positividade se confirmar nas duas hemoculturas do mesmo doente ou com base na história clínica (transplantado, imunodeprimido, serviço de cardiologia, hematologia e medicina intensiva)
	2 tipos de colónias	Identificação e repicagem para CLED ou CNA ou GS consoante seja BGN ou CGP

Em amostras de sangue colhido a partir de um cateter, deve também ser colhida uma amostra por punção venosa e cultivada para confirmar a suspeita de bacteriémia.

Os cateteres intravasculares são extremamente vulneráveis à colonização e formação de biofilme por organismos frequentemente encontrados à superfície da pele, com consequente disseminação para a corrente sanguínea. (1)

Tabela 11 Modo de processamento de cateteres intravenosos

Exame microscópico	Não aplicável	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose Sangue Brain Heart Infusion
	Processamento	Sementeira por rolamento
	Incubação	18 a 24h a 37°C

Relativamente às bactérias responsáveis por este tipo de infeção, as mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. (9)

IV. Líquido Cefalorraquidiano

As infecções do sistema nervoso central (SNC) são graves e geralmente, são provocadas pela passagem dos patógenos através das barreiras naturais. As mais comuns são a encefalite, que corresponde à inflamação da massa branca do cérebro e a meningite, que corresponde à inflamação das meninges em torno do cérebro. (17)

O diagnóstico presuntivo é feito com base na idade do paciente, presença de fatores de risco, história clínica, exame físico, epidemiologia local de infecções do SNC, análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) e estudos radiológicos.

Líquido cefalorraquidiano (LCR) é produzido continuamente na base do cérebro e é reabsorvido na corrente sanguínea em locais especializados. É um fluido estéril com escassez de leucócitos e proteínas como as imunoglobulinas e, portanto, a sua capacidade de defesa contra organismos invasores é baixa. (4)

As amostras do LCR são colhidas por punção lombar e devem ser imediatamente transportadas para o laboratório e processadas o mais rápido possível uma vez que a colheita é um procedimento delicado. A concentração da amostra por centrifugação aumenta o rendimento do microrganismo para o exame microscópico e a cultura. Geralmente, são obtidos três tubos de LCR, cada um contendo 1 ou 2 mL de líquido. Na meningite bacteriana aguda, o LCR tem aspeto turvo devido aos elevados níveis de proteína.

O agente etiológico é identificado através de testes laboratoriais e a observação do esfregaço corado pelo método de Gram é importante. Um resultado positivo deve ser comunicado imediatamente ao clínico.

Os agentes bacterianos como estreptococos do grupo B, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* são mais comuns em recém-nascidos e *Neisseria meningitidis* em jovens adultos. Nos idosos e nas crianças é frequente o isolamento de *Streptococcus pneumoniae* como causa da infecção. (7, 9)

Tabela 12 Processamento do LCR

Exame macroscópico	Observar a cor e a turbidez	
Exame microscópico	Coloração de Gram	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose de Sangue PVX Brain Heart Infusion
	Processamento	Sementeira por inundação
	Incubação	24 a 72h a 37°C em atmosfera aerofílica

V. Outros Líquidos Orgânicos

Os líquidos orgânicos são normalmente estéreis e qualquer microrganismo identificado deve ser investigado. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado. (7)

A colheita é feita por punção, segundo uma técnica asséptica, para um recipiente seco e esterilizado. Os fluídos normalmente estéreis devem ser concentrados por centrifugação e inoculados diretamente no meio apropriado. (7) Normalmente, o exame microscópico do fluido analisa a flora existente, mas também o número de glóbulos brancos, proteínas e glicose. (9) Nas tabelas seguintes é apresentado o modo de processamento das amostras de líquido pleural, peritoneal e sinovial. (Tabela 13 e 14)

V.I Líquido Pleural

Tabela 13 Processamento de líquido pleural

Exame microscópico	Coloração de Gram	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose de Sangue PVX Brain Heart Infusion
	Processamento	Sementeira por esgotamento Sementeira por dispersão
	Incubação	18 a 24h a 37°C

V.II Líquido Peritoneal e Sinovial

Tabela 14 Processamento de líquido peritoneal e sinovial

Exame microscópico	Coloração de Gram	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose de Sangue CNA Cooked meat
	Processamento	Sementeira por esgotamento Sementeira por dispersão
	Incubação	18 a 24h a 35°C

VI. Secreções respiratórias: expectoração, secreções brônquicas, aspirado transtraqueal, lavado brônquico e lavado bronco-alveolar.

Em termos de infecções do trato respiratório, elas variam com o local anatômico da infecção. Há infecções do trato respiratório inferior (Tabela 15) e infecções do trato respiratório superior (Tabela 16) que têm agentes etiológicos característicos. (1)

Tabela 15 Infecções do trato respiratório inferior

Infeções do trato respiratório inferior	Patógenos mais comuns
Bronquite	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Bordetella pertussis</i>
Pneumonia da comunidade	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Legionella</i>
Pneumonia nosocomial	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistentes (MRSA) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacteriaceae <i>Klebsiella spp.</i> <i>Echerichia coli</i>
Pneumonia por aspiração	Bactérias anaeróbias: <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pneumonia crônica	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> e micobactérias não tuberculosas

Tabela 16 Infecções do trato respiratório superior

Infeções do trato respiratório superior	Patógenos mais comuns
Faringite	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Sinusite	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
Otite Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Epiglotite	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococci</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Klebsiella spp.</i>
Laringite	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistentes (MRSA)

O diagnóstico das infecções respiratórias é dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal, constituída por bactérias aeróbias e anaeróbias, durante a colheita. (7)

O laboratório deve valorizar apenas amostras de boa qualidade que são avaliadas por exame direto ao microscópio ótico com objetiva 10x e a interpretação do resultado deve ser baseada nas características da amostra, como a presença de glóbulos brancos, células epiteliais pavimentosas e restante flora bacteriana. (1, 17) A classificação das amostras baseia-se na tabela de Murray e Washington que corresponde à Tabela 17.

Tabela 17 Tabela de Murray e Washington (Adaptada de Connie, Mahon)

Grupo	Células Epiteliais	Leucócitos
1	> 25	< 10
2	> 25	10 – 25
3	> 25	> 25
4	10 – 25	> 25
5	< 10	> 25

Segundo este critério, as amostras biológicas com 25 ou mais células epiteliais por campos, são geralmente recusadas para exame bacteriológico por contaminação excessiva. As amostras de boa qualidade são processadas de acordo com a tabela 18 e 19.

Tabela 18 Processamento de expetorações e aspirados transtraqueais

Exame microscópico	Coloração de Gram	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose de Sangue HAE
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	24 a 48h a 37°C em atmosfera 5% de CO ₂

Tabela 19 Processamento de lavados brônquicos e bronco-alveolares

Exame microscópico	Coloração de Gram	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose de Sangue PVX HAE
	Processamento	Sementeira por esgotamento
	Incubação	24 a 48h a 37°C em atmosfera 5% de CO ₂

VII. Exsudados Purulentos: zaragatoas e aspirados de feridas, aspirados de pus de abcesso, material de tecidos e biópsias.

As amostras de exsudados purulentos devem ser colocadas em contentores esterilizados e devem ser transportadas ao laboratório o mais rápido possível. A colheita dos exsudados profundos deve ser realizada por punção e aspiração com agulha e seringa. No caso de a lesão ser aberta, a colheita é feita com zaragatoa e esta é colocada em meio de transporte. (7) Os procedimentos aplicados estão descritos na tabela seguinte.

Tabela 20 Processamento de exsudados purulentos

Exame microscópico	Coloração de Gram	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose de Sangue CNA Cooked meat
	Processamento Incubação	Sementeira por esgotamento 18 a 24h a 37°C

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

As amostras para o diagnóstico de infeções do aparelho genital dependem do local da infeção e dos microrganismos. Algumas infeções têm origem em microrganismos endógenos, cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrios da flora comensal. (7)

No laboratório de bacteriologia do CHUC, a valorização clínica das culturas é efetuada de acordo com a informação clínica do doente e o exame direto a fresco e após coloração.

Tabela 21 Processamento de exsudados genitais

Exame microscópico	Coloração de Gram	
Exame Cultural	Meio de cultura	Gelose de sangue CNA PVX/VCAT Cooked meat
	Processamento Incubação	Sementeira por esgotamento 24 a 48h a 35-37°C

I.1.2. Laboratório de Micobacteriologia:

As bactérias do género *Mycobacterium spp.* são bacilos aeróbios, imóveis, não formadores de esporos. A parede celular contém na sua constituição um conteúdo lipídico com elevada percentagem de ácidos micólicos, que são ácidos gordos de cadeia longa que formam uma barreira de permeabilidade hidrofóbica. Por causa dessa estrutura da parede celular, as micobactérias são resistentes à descoloração pelas soluções ácidas utilizadas na coloração de Gram. Uma vez corados estes bacilos não podem ser descorados e por isso são classificadas como bactérias ácido-álcool resistentes (BAAR). Pelo facto de ser um grupo de bactérias exigente e que cresce muito lentamente, as culturas são avaliadas durante 6 semanas para que seja observado ou não crescimento. (3, 9)

Apesar da abundância de espécies de micobactérias, apenas as seguintes espécies causam a maioria das infeções humanas: complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae*, complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. (3)

I.1.2.1. Diagnóstico Laboratorial

As amostras que chegam ao laboratório de micobactérias são essencialmente do trato respiratório (expetorações, lavados e aspirados) mas também podem aparecer amostras de urina, líquidos orgânicos, LCR, fezes, suco gástrico e biópsias.

O diagnóstico é baseado na observação microscópica, no isolamento bacteriano obtido por cultura e na identificação molecular dos bacilos.

I. Descontaminação e Concentração das amostras

O processamento para recuperar e identificar bacilos álcool-ácido resistentes de amostras clínicas envolve várias etapas. Este processamento engloba a digestão, descontaminação e a posterior concentração das amostras.

Uma solução de N-acetil-L-cisteína (NALC) combinada com NaOH 2%, é utilizada como digestivo e descontaminante. De seguida a amostra é lavada com tampão fosfato de modo a neutralizar o efeito da solução de NALC-NaOH e por fim, é concentrada por centrifugação. Amostras como LCR, provenientes de locais anatómicos estéreis, podem ser diretamente centrifugadas, examinadas microscopicamente e inoculadas no meio de cultura. (9)

II. Exame Direto



Figura 7 Coloração pelo método de Kinyoun

O exame microscópico das amostras é um método sensível e rápido de rastreio da doença por micobactérias. (17) Tipicamente, as colorações aplicadas a BAAR são as colorações de Ziehl-Neelsen e Kinyoun. Estes métodos utilizam como corante primário a fucsina, como agente descorante um ácido-álcool e como corante de contraste o azul-de-metileno. (3) A coloração de Ziehl-Neelsen requer aquecimento da lâmina para melhor penetração do corante na parede celular micobacteriana. Já a coloração de Kinyoun é uma coloração a frio e é este o procedimento utilizado no laboratório de Micobacteriologia do CHUC. As bactérias do género *Mycobacterium* spp. aparecem coradas de vermelho, enquanto que a flora contaminante aparece a azul, tal como está demonstrado na Figura 8. (9) Esta reação de coloração permite, através da observação do tamanho e forma das bactérias, orientar o diagnóstico.

III. Cultura

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

Tabela 22 Meios de cultura utilizados no laboratório de micobacteriologia

Meios de Cultura	Incubação
<p>O tubo indicador de crescimento de micobactérias (MGIT) contém meio de crescimento Middlebrook 7H9 acrescido de um indicador de fluorescência destinado à deteção manual e recuperação de micobactérias. A adição de uma mistura de antibióticos (PANTA) inibe o crescimento de flora normal e favorece o crescimento e a deteção de micobactérias. Essa mistura de antibióticos consiste em polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina.</p> <p>Uma cultura positiva pode ser identificada de forma manual ou pelo sistema BD BACTER MGIT 960. De forma manual a identificação faz-se através da observação da turbidimetria não homogénea, ou por fluorescência utilizando uma lâmpada com comprimento de onda UV elevado. O sistema BD BACTEC MGIT 960 utiliza uma tecnologia fluorométrica para facilitar a deteção precisa do consumo de oxigénio que é diretamente proporcional ao crescimento de micobactérias. (1)</p>	<p>A incubação é feita no interior do BACTEC MGIT 960. Este equipamento é capaz de detetar o crescimento das micobactérias num tempo médio de 13.3 dias. (20)</p>

BD BACTEC™ MGIT™
PANTA™

<p>É o meio sólido utilizado para a cultura e isolamento de micobactérias. A sua fórmula contém glicerol, farinha de batata, sais e ovos inteiros (a coagulação da albumina dos ovos é utilizada para solidificar o meio). (3) Ao meio é adicionado RNA para melhorar a recuperação de bacilos ácido-álcool resistentes. O meio torna-se seletivo pela adição de verde-malaquite, que inibe bactérias Gram positivas e penicilina que inibe bactérias Gram positivas e Gram negativas. (9)</p>	<p>Incubação a 35-37°C em atmosfera 5-10% de CO₂ durante 6 semanas. Se os resultados forem negativos a amostra é excluída. Se existir uma coloração positiva, ou suspeita de bactéria de crescimento lento, deve-se fazer uma nova inoculação e esta deve ser incubada a uma temperatura mais baixa 24-33°C. Ambas devem ser incubadas por mais 1 semana. (8)</p>	<p>Meio de Lovenstein-Jensen</p>
--	--	--------------------------------------

IV. Identificação

A observação microscópica de bacilos ácido-álcool resistentes é muito importante porque revela o aspeto característico (ex. cordas, aglomerados, disperso) das bactérias e orienta a sua identificação.

A identificação pode ser feita por vários métodos, no entanto o mais utilizado no laboratório do CHUC é baseado em testes moleculares.

Tabela 23 Testes de genética molecular para identificação de micobactérias

GenoType Mycobacterium AS	Teste de genética molecular para a identificação de micobactérias não tuberculosas a partir de material de cultura.
GenoType Mycobacterium CM	Teste de genética molecular para a identificação, a partir de material de cultura, das espécies de micobactérias clinicamente mais relevantes. Permite uma diferenciação rápida e segura das micobactérias relevantes e, portanto, permite uma aplicação rápida de um tratamento específico e de medidas preventivas.
GenoType MTBDRplus	Teste de genética molecular para a identificação de <i>M. tuberculosis</i> complex e da resistência à rifampicina e isoniazida a partir de material de cultura.

Estes testes são baseados na tecnologia DNA-STRIP e o procedimento completo é dividido em três passos: (i) extração do ADN a partir de material cultivado (meio sólido/líquido; os reagentes necessários não são fornecidos), (ii) uma amplificação multiplex com primers biotinilados, e (iii) uma hibridização reversa. Todos os reagentes necessários para amplificação, tal como polimerase e primers estão incluídos nas misturas de amplificação A e B (AM-A e AM-B) que foram otimizadas para este teste. As tiras de membrana são recobertas com sondas específicas complementares aos ácidos nucleicos amplificados. Após a desnaturação química, os amplicons de cadeia única ligam-se às sondas (hibridização). A ligação muito específica de cadeias complementares de ADN é assegurada por condições estritas que são o resultado da combinação da composição do tampão e uma certa

temperatura. Assim as sondas distinguem com segurança as diferentes seqüências das espécies bacterianas. A streptavidina conjugada com a fosfatase alcalina, liga-se à biotina dos amplicons por via da streptavidina. Finalmente, a fosfatase alcalina transforma o substrato adicionado num corante que se torna visível nas tiras de membrana como um precipitado colorido. Um modelo assegura uma interpretação fácil e rápida do padrão de bandas obtido. (22)

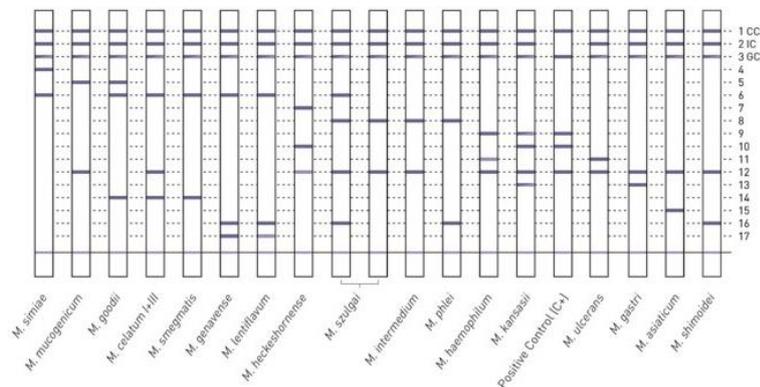


Figura 8 GenoType Mycobacterium AS utilizado na diferenciação de espécies não tuberculosas clinicamente relevantes (Hain Lifescience, 2017)

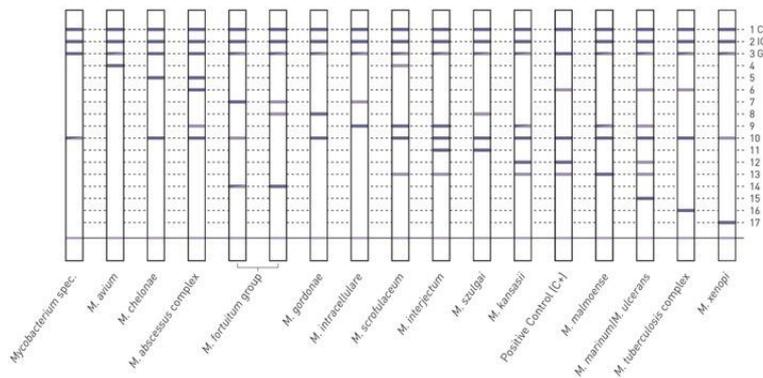


Figura 9 GenoType Mycobacterium CM utilizado na identificação das espécies do complexo *M. tuberculosis* e na diferenciação de espécies não tuberculosas clinicamente relevantes (Hain Lifescience, 2017)

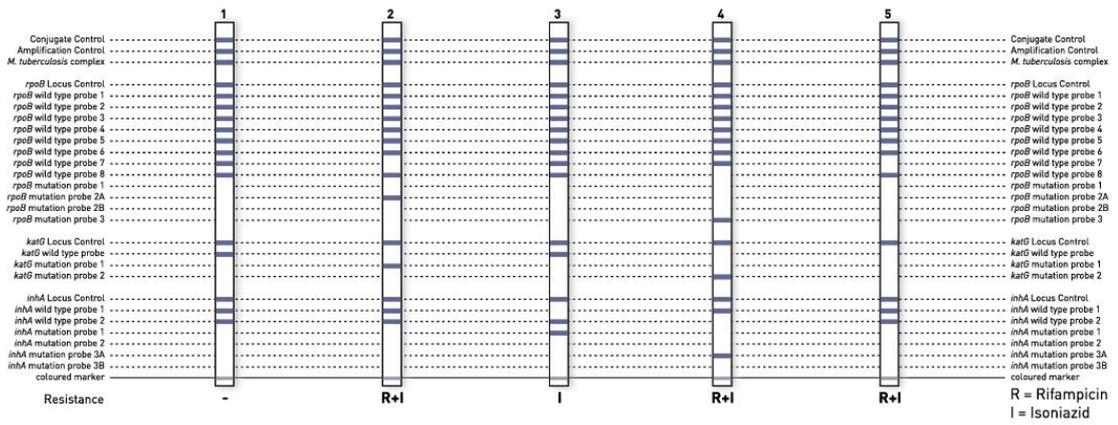


Figura 10 Geno Type MTBDR plus utilizado na identificação da resistência à rifampicina e à isoniazida (Hain Lifescience, 2017)

2. Bioquímica

A bioquímica é a ciência que estuda as reações químicas que ocorrem nos seres vivos e que permite caracterizar e compreender o funcionamento das células, tecidos e órgãos. É fundamental na prática clínica porque fornece descrições de processos patológicos e explicações para doenças a nível molecular. (21) Neste setor, são efetuadas análises qualitativas e quantitativas em amostras biológicas como sangue, urina, líquido cefalorraquídeo, fezes e cálculos renais que podem facilitar o diagnóstico, tratamento e monitorização de patologias. A amostra biológica por eleição para obtenção dos parâmetros bioquímicos é o soro. Os testes laboratoriais devem ser realizados com a maior precisão possível. São analisados diversos parâmetros descritos na Tabela 25.

Relativamente à bioquímica urinária são determinados parâmetros característicos para avaliação da lesão renal. É feita a sumária de urina (urina tipo II) que inclui características físicas como cor e aspeto e a avaliação bioquímica que comporta parâmetros como densidade, pH, proteínas, glicose, hemoglobina, corpos cetónicos, bilirrubina, urobilinogénio, nitritos e leucócitos. Frequentemente é avaliado também o sedimento urinário por citometria de fluxo e impedância para contagem de elementos celulares, cilindros e cristais. No Anexo B são referidos os equipamentos e as técnicas utilizadas para efetuar as análises bioquímicas.

Tabela 24 Parâmetros analisados em Bioquímica Clínica de acordo com a função a que correspondem

Parâmetros Analisados	
Função Renal	Azoto ureico, Creatinina, Ácido úrico, Sódio, Potássio, Cloro, Osmolalidade, Cálcio, Magnésio, Fósforo, Glicose, Hemoglobina glicada, Proteínas totais, Albumina
Função Hepato-Biliar	Alanina aminotransferase, Aspartato aminotransferase, Fosfatase alcalina, Gama-glutamyl transferase, Bilirrubina,
Função Gastrointestinal e Pancreática	Alfa-amilase, Lipase
Marcadores de destruição celular	Creatina Cinase, Lactato desidrogenase,
Lípidos	Colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Triglicéridos,
Marcadores de infeção e inflamação	Proteína C-reativa
Metais	Lítio, Cobre, Zinco, Alumínio,
Catecolaminas	Adrenalina, Noradrenalina, Dopamina,
Química hematológica	Glicose 6-fosfato-desidrogenase
Estudo do Ferro	Ferro sérico, Ferritina, Saturação da transferrina, Capacidade de fixação do ferro disponível / Capacidade total de fixação do ferro
Bioquímica urinária	Proteínas urinárias, Sumária de urina (Urina tipo 2), Sedimento urinário, Osmolalidade, pH, Densidade

3. Imunologia

A imunologia estuda as respostas imunes e os eventos celulares e moleculares que ocorrem após um organismo encontrar microrganismos ou macromoléculas estranhas. Define-se como o estudo das defesas do organismo contra a infecção. (26, 27) Os seres humanos vivem rodeados de microrganismos e muitos deles têm capacidade de causar doença. O sistema imunológico protege o corpo contra agentes infecciosos e contra os danos por eles provocados. (26) A imunidade como forma de resistência às lesões causadas pelos microrganismos e seus produtos, pode ser classificada em imunidade inata ou imunidade adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo que se gera à nascença. (28) Corresponde à capacidade do indivíduo resistir à infecção por meio de funções corporais normalmente presentes como barreiras físicas, celulares, fisiológicas e inflamatórias. Uma segunda forma de imunidade é a imunidade adaptativa que é um tipo de resistência que se caracteriza pela especificidade para cada agente patogénico e pela capacidade de criar memória celular. Tem uma ação mais lenta porque depende de exposição prévia. É dependente das células B e T, mediadoras da imunidade humoral e celular, respetivamente. (28) Compreender o funcionamento do sistema imunológico forneceu ferramentas essenciais para o tratamento e a prevenção de várias doenças. (29)

O setor de Imunologia do CHUC engloba o laboratório de imunologia e o laboratório de autoimunidade. As amostras biológicas são recebidas e separadas na cadeia do *CoreLab* e só depois são levadas para o respetivo laboratório onde são processadas nos devidos equipamentos.

3.1 Imunologia

No laboratório de imunologia é feito o doseamento de imunoglobulinas, cadeias leves e proteínas do complemento através de métodos nefelométricos e turbidimétricos; deteção de IgE's específicas para o estudo de alergias pelo método FEIA (*Fluorescence enzyme immunoassay*) e estudo das proteínas séricas através do proteinograma e imunofixação. As amostras biológicas mais utilizadas para os testes imunológicos são o soro e a urina.

3.1.1. Laboratório de Imunologia

3.1.1.1. Parâmetros Imunoquímicos

Os parâmetros imunoquímicos são determinados de forma automatizada por neflometria no laboratório de Imunologia do CHUC. Os equipamentos utilizados neste setor estão descritos no Anexo B.

Tabela 25 Parâmetros analisados pelos equipamentos BN PROSPEC I e II

Aparelho	Parâmetros
BN PROSPEC I	Haptoglobina; Cistatina; Fator Reumatóide; Título da anti-estreptolisina O; Subclasses IgG; Cadeias k e λ na urina; β2-microglobulina na urina
BN PROSPEC II	Apolipoproteína E; Imunoglobulina (Ig) A, G, M, D; Imunoglobulina G no LCR; Albumina no soro e no LCR; ADNase; Complemento C1q e C1 Inibidor; Recetor solúvel da transferrina; Proteína de ligação ao retinol; Properdina fator B; α-glicoproteína

3.1.1.2 Eletroforese das Proteínas

O laboratório de Imunologia dos CHUC utiliza equipamentos semiautomáticos como os HYDRASYS 2 e HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING, ambos da Sebia, para a execução das técnicas eletroforéticas que estão descritos no Anexo B. Estes equipamentos processam os géis de agarose iniciando o procedimento pela aplicação da amostra, migração eletroforética, secagem, coloração, descoloração e secagem final. No final as amostras são avaliadas visualmente e comparadas com o padrão de bandas de referência. A densitometria fornece a quantificação precisa das zonas individuais. (30) Atualmente no laboratório de imunologia do CHUC também é efetuada eletroforese capilar.

I. Soro

Os proteinogramas são obtidos a partir da eletroforese das proteínas séricas e permitem a deteção de anomalias no perfil eletroforético, importantes no diagnóstico de diversas patologias. A eletroforese em gel de agarose é uma técnica de separação muito utilizada pelos laboratórios. A pesquisa das proteínas séricas é feita com auxílio do kit HYDRAGEL PROTEIN(E) da SEBIA ao qual podem ser aplicadas amostras de soro.

Se a eletroforese for realizada a pH 9.1, as proteínas séricas constituintes das amostras biológicas aplicadas no gel de agarose, são separadas com base no tamanho e na carga e coradas com negro de amido para que possam ser analisadas. O perfil eletroforético é constituído por cinco frações principais: Albumina, α_1 Globulinas, α_2 Globulinas, β Globulinas e γ Globulinas (Figura 12.A). Cada uma das frações identificadas pela eletroforese é constituída por diferentes proteínas que migram de acordo com a sua carga. (Figura 12.B) (30) É importante relacionar a eletroforese de proteínas com o doseamento das proteínas totais do soro. (31)

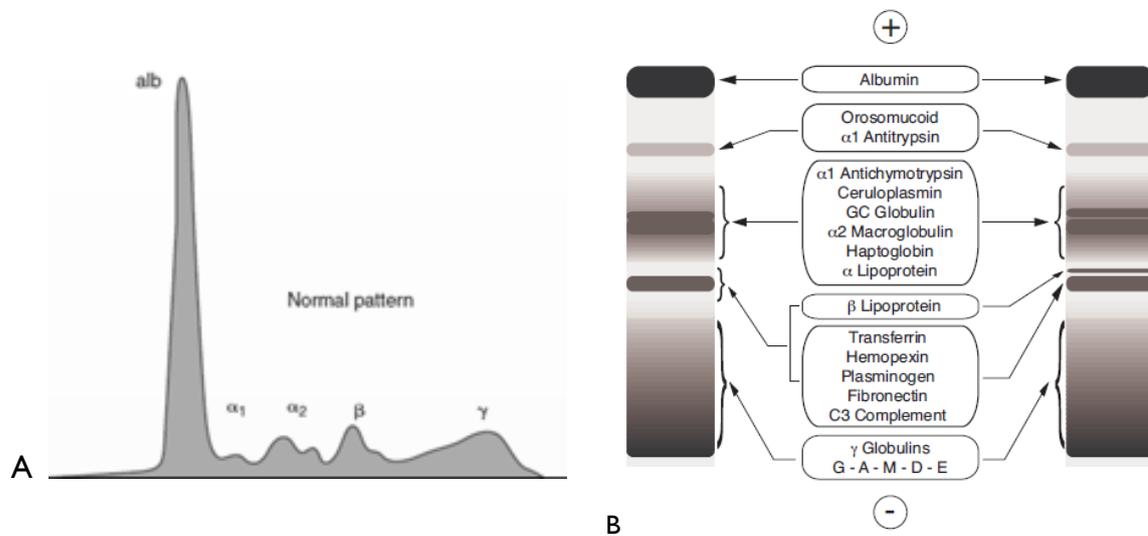


Figura 11 A. Perfil eletroforético de migração em função da carga. B. Frações identificadas pela eletroforese e proteínas constituintes de cada fração (Sebia, 2012)

As alterações observadas no perfil eletroforético podem estar associadas a patologias, consoante as frações possam estar aumentadas ou diminuídas tal como está descrito na tabela seguinte.

Tabela 26 Alterações nas frações constituintes do perfil eletroforético e possível associação a patologias (Adaptado de Chernecky and Berger, 2008)

Aumentada	Diminuída
Fração de Albumina	
Desidratação	Malnutrição; Gravidez; Doença renal (Síndrome nefrótico); Doença hepática; Doenças inflamatórias; Enteropatias com perda proteica

Fração de $\alpha 1$ Globulinas	
Doenças inflamatórias agudas ou crônicas	Enfisema congênito (deficiência de $\alpha 1$ -antitripsina; doença genética rara); Doença hepática grave
Fração de $\alpha 2$ Globulinas	
Doença renal (Síndrome nefrótica); Doença inflamatória aguda ou crônica	Hipertireoidismo; Doença hepática grave; Hemólise
Fração de β Globulinas	
Hipercolesterolemia; Anemia ferropriva; Mieloma múltiplo	Malnutrição; Cirrose
Fração de γ Globulinas	
<p>Policlonal: Doença inflamatória crônica; Artrite reumatóide; Lúpus Eritematoso Sistêmico; Cirrose; Doença hepática crônica; Infecção aguda e crônica; Imunização recente</p> <p>Monoclonal: Macroglobulinemia de Waldenstrom; Mieloma múltiplo; Gamopatia monoclonal de significado clínico indeterminado (MGUS)</p>	Diversas doenças imunes genéticas; Deficiência imune secundária

II. Urina

No caso das amostras de urina, a eletroforese é aplicada com o objetivo de pesquisar a presença de proteinúria. O procedimento implica a utilização do kit HYDRAGEL 5 PROTEINURIE, cuja eletroforese é feita em géis de SDS-agarose. O excesso de SDS (dodecil sulfato de sódio) forma um complexo com as proteínas da amostra e altera a conformação original das mesmas. Todas as proteínas assumem a mesma conformação e carga negativa. Quando submetidas à eletroforese, há separação das proteínas de acordo com o peso molecular. Os padrões eletroforéticos são corados com violeta ácido e comparados com os marcadores de referência para identificar as proteínas urinárias individuais e classificar a proteinúria em fisiológica, glomerular, tubular ou mista (Figura 13). (31)

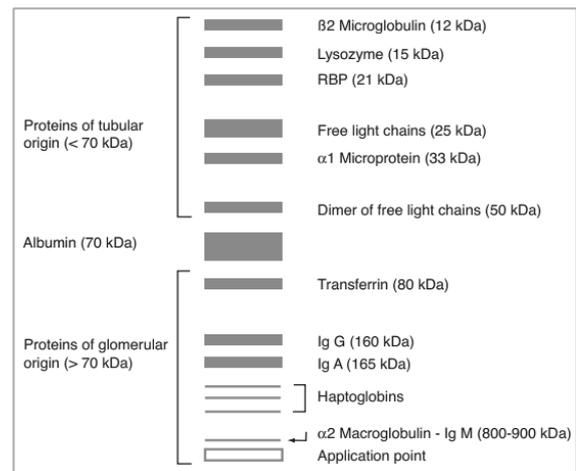


Figura 12 Padrão eletroforético das proteínas urinárias (Sebia, 2013)

3.1.1.3. Imunofixação

A imunofixação é utilizada como uma técnica de detecção de proteínas monoclonais em amostras de soro e urina. O aparecimento de bandas anormais nos padrões eletroforéticos, principalmente nas zonas de beta-globulina e gama-globulina, são sempre suspeitas de serem

proteínas monoclonais e, portanto, uma indicação de gamopatias monoclonais. As proteínas separadas por eletroforese são incubadas com anti-soros específicos contra cadeias pesadas gama (IgG), alfa (IgA), mu (IgM) e cadeias leves kappa (k) e lambda (λ). Os anti-soros difundem-se no gel e precipitam os antigénios correspondentes, quando estão presentes. As proteínas são fixadas e as que não precipitarem são removidas do gel por absorção e lavagem. Por fim, as proteínas precipitadas são coradas com violeta ácido ou negro de amido.

Os padrões das bandas são comparados visualmente com as bandas do padrão de referência e é feita a interpretação. A presença de uma proteína monoclonal (gamapatia) é caracterizada por uma banda monoclonal detetada com um dos anti-soros anti-cadeia pesada e com um anti-soro de cadeia leve. A ausência de reação com qualquer um dos anti-soros de cadeia pesada aplicados e a reação com um dos anti-soros de cadeia leve pode indicar uma gamapatia Ig D ou Ig E ou uma gamapatia de cadeias leves. Deve ser feita uma pesquisa adicional.

No caso da urina, a imunofixação avalia a presença de uma imunoglobulina monoclonal, mas também a natureza da Proteína de Bence Jones. Uma proteína monoclonal intacta é caracterizada por uma banda monoclonal detetada com um dos anti-soros anti-cadeia pesada e com anti-soro de cadeia leve. (31)

3.2 Autoimunidade

O setor da autoimunidade ocupa-se do estudo das doenças autoimunes, através da pesquisa e doseamento de autoanticorpos (AAcs) e anticorpos (Acs) em amostras de soro de doentes. Os resultados obtidos são importantes para o prognóstico e diagnóstico e, em alguns casos, para o seguimento da doença autoimune (DAI).

Os testes laboratoriais são executados através de técnicas como imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), FEIA, *Imunobloting* e RIA (*Radio Immuno Assay*) pelos equipamentos descritos no Anexo B.

3.2.1. Doenças Autoimunes

O sistema imunitário (SI) é constituído pelas células e moléculas responsáveis pela imunidade e tem como função biológica a defesa do organismo.

As doenças autoimunes são definidas como distúrbios que ativam respostas imunológicas direcionadas a autoantígenos expressos pelas células e pelos tecidos do próprio corpo, em órgãos transplantados ou na microbiota comensal que povoa o trato intestinal e que resultam em lesões nos órgãos e tecidos corporais. Normalmente a cinética do desenvolvimento da doença autoimune é prolongada, entre o início dos sintomas e a demonstração fenotípica da doença. (26, 33)

Ao longo do desenvolvimento dos linfócitos, são feitos rearranjos aleatórios que resultam inevitavelmente na formação de algumas células com afinidade por antígenos próprios. Esses linfócitos são normalmente removidos ou retidos por mecanismos de seleção negativa. Gera-se um estado de autotolerância, que impede o sistema imunitário de atacar os tecidos normais do corpo. (34)

Assim, a autoimunidade representa uma falha dos mecanismos básicos de tolerância imunológica e na discriminação do “próprio” e “não-próprio”. As respostas autoimunes são especificamente ativadas por antígenos próprios e levam à produção de células auto-reativas efectoras e autoanticorpos, contra antígenos próprios. Quando a regulação destas respostas ocorre de forma inapropriada, podem originar inúmeras síndromes crónicas denominadas doenças autoimunes, muito variadas em termos de gravidade, tecidos afetados e mecanismos efetores. (26)

Existem dois tipos de respostas autoimunes: Fisiológica - em que autoanticorpos ajudam nas respostas imunológicas “protetoras” contra agentes ambientais, biológicos ou químicos prejudiciais. São geralmente transitórias, sem doença clínica; e Patológica - na qual autoanticorpos e células reguladoras ativadas destroem tecidos e órgãos portadores de autoantígenos por citólise direta auxiliada por mediadores inflamatórios. Estão geralmente associadas a estimulação imunológica recorrente ou sustentada e lesão tecidual e podem resultar em doença clínica. (35)

A classificação das DAIs pode ser feita em função dos órgãos envolvidos (sistémica) ou em função de um órgão (específica de órgão). (Tabela 27 e 28) Na DAI específica de órgãos, os Acs e células T reagem contra autoantígenos (AAg) que só existem em determinados tipos de células, tecidos ou órgãos. As DAI sistémicas ocorrem quando os Acs produzidos

têm afinidade para um Ag comum a muitas células. Todas as células portadoras desse Ag vão ser afetadas devido à acumulação de complexos Ag-Ac o que leva ao desenvolvimento de reações inflamatórias e danos teciduais. A presença de AAcS por si só, não é sinónima de DAI. O quadro clínico deve ser compatível e os estudos subsequentes e monitorização devem ser preditivos de certas patologias. Fatores genéticos, ambientais e hormonais podem modular as respostas imunológicas e contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade e DAIs. (35)

Doenças Autoimunes Sistêmicas

Tabela 27 Doenças autoimunes sistêmicas, sistemas de órgãos envolvidos e imunopatologia (Adaptado de Perl, Andras)

Doença	Sistema de Órgãos e Imunopatologia
Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE)	Afeta todos os sistemas de órgãos, principalmente articulações, pele, vasos sanguíneos, membranas serosas, rins, pulmões, coração; Anticorpos antinucleares (ANA)
Arterite Reumatoide (RA)	Afeta articulações, vasos sanguíneos, membranas serosas, pulmão; Fator Reumatoide
Espondilite Anquilosante	Afeta maioritariamente as articulações axiais e menos frequentemente as articulações periféricas, uveíte e aortite
Esclerose Sistêmica	Afeta a pele, vasos sanguíneos, intestino, pulmão, coração, rim.
Psoríase	Afeta a pele e as articulações
Síndrome Sjogren	Afeta as glândulas salivares e lacrimais, pâncreas, pulmão, rim; Anticorpos SSA e SSB; Infiltração linfocítica dos tecidos envolvidos
Doenças inflamatórias Intestinais	Afeta o intestino delgado e/ou o intestino grosso, articulações e úvea; Anticorpos citoplasmáticos perinucleares anti-neutrófilos direcionados à mieloperoxidase (ANCA)

Doenças Autoimunes Específicas de Órgãos

Tabela 28 Doenças autoimunes específicas de órgãos (Perl, Andras)

Doença	Órgãos e Imunopatologia
Diabetes Mellitus insulino-dependente	Pâncreas; Anticorpos anti-insulina e anti-ácido glutâmico descarboxilase
Esclerose Múltipla	Sistema Nervoso Central; Reatividades de células T de anti-mielina e anticorpos
Miastenia Gravis	Sistema Nervoso Periférico; Anticorpos para o recetor acetilcolínico
Vitiligo	Pele
Anemia Perniciosa	Estômago; Anticorpos para o Fator Intrínseco
Colangite Biliar Primária	Fígado; Anticorpos direcionados à piruvato desidrogenase
Hepatite Autoimune	Fígado; Anticorpos direcionados ao citocromo p450

3.2.2 Laboratório de Autoimunidade

As amostras biológicas utilizadas no setor da autoimunidade chegam ao *CoreLab*, são separadas pela cadeia automatizada e saem no equipamento P450 tal como está descrito no Anexo A. Daqui, as amostras, são transportadas até ao local de processamento.

Assim que dão entrada no laboratório de autoimunidade, as amostras de soro são separadas em duas alíquotas e é adicionada uma gota de azida de sódio a cada uma delas como forma de preservar a estabilidade dos Acs que possam estar presentes. Uma das amostras é utilizada para o processamento do dia-a-dia e pode ser conservada entre os 2°C e os 8°C pelo período de uma semana até que estejam concluídos todos os pedidos para a amostra e a outra é conservada a -20°C durante 3 meses.

O processo laboratorial é efetuado em duas fases: a fase de despiste ou pesquisa em que é feito um ensaio multi-específico de maior sensibilidade por Imunofluorescência Indireta (IFI) e uma segunda fase de confirmação ou identificação por meio de um ensaio mono-específico através de técnicas mais específicas como ELISA, FEIA, Immunoblot ou CLIA. Os equipamentos estão descritos no Anexo B.

3.2.2.1. Imunofluorescência Indireta

A introdução de novas metodologias, aumentou a eficácia e competência no diagnóstico das DAIs com impacto na clínica e no laboratório.

No laboratório de imunologia, a IFI, é utilizada para determinar a presença diversos autoanticorpos incluindo os anticorpos antinucleares (ANA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA), anticorpos anti-microsomas renais e hepáticos (anti-LKMI), anticorpos anti-mitocôndrias (AMA) e anticorpos anti-citoplasma de granulócitos (ANCA).

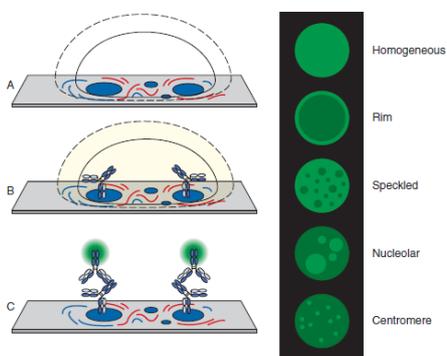
Na primeira etapa desta técnica, o antígeno preso na fase sólida, liga um primeiro anticorpo, de seguida é feita uma lavagem da solução para remover o anticorpo não ligado e posteriormente é adicionado um segundo anticorpo marcado com um fluorocromo. Se o resultado da amostra for positivo, o primeiro anticorpo está presente no soro do doente. A ligação do segundo anticorpo marcado com fluorescência, permite a visualização do complexo no microscópio de fluorescência. (37)

A positividade ou negatividade dos resultados é expressa com base em títulos de diluição de acordo com o tipo de anticorpo. No caso da determinação de anticorpos antinucleares

em crianças com idade inferior a 5 anos, a base de titulação é 1:80, já para os adultos este título é positivo para 1:160. A determinação de anticorpos do mosaico hepático em crianças corresponde a 1:40 e em adultos a 1:100. Para amostras positivas, a titulação prossegue até ao título de 1:1280.

Os aparelhos utilizados na realização das técnicas por IFI são o IF Sprinter: equipamento de preparação de lâminas de forma automatizada e o EUROPattern: equipamento de microscopia automatizada que reconhece os padrões e designa títulos. No entanto, os resultados obtidos neste equipamento são confirmados antes de serem validados.

I. Anticorpos Antinucleares



Sabendo que os autoanticorpos são biomarcadores das DAIs, a pesquisa e identificação de anticorpos antinucleares (ANA) é fundamental para o diagnóstico de muitas doenças. Além disso, estes anticorpos podem estar presentes anos antes do aparecimento evidente da doença e, para algumas doenças, os ensaios serológicos podem fornecer informações úteis sobre a probabilidade do curso clínico. Assim, a determinação de ANA pode permitir a previsão, diagnóstico

Figura 13 IFI para pesquisa de ANAs e determinação da atividade de certas doenças autoimunes. (Adaptado de Stevens, Christine (38) Dorresteyn)

A IFI é o método “gold” standard para a deteção de ANA. A realização desta técnica requer diluições sucessivas dos soros positivos, determinação visual do padrão de fluorescência e um segundo teste para determinar a especificidade do antigénio. A principal limitação deste método é a sua baixa especificidade. (38)

O teste passa pela utilização de um substrato constituído por células do tumor da laringe em cultura, correspondentes à linha celular HEp-2. São células de origem humana, com núcleos grandes, elevada sensibilidade para a identificação de vários padrões, o crescimento é feito em camada e permite a visualização de todos os núcleos e células em diferentes estádios de mitose. A deteção de fluorescência corresponde à ligação de anticorpos conjugados a qualquer estrutura da célula. Em cada lâmina é sempre colocado um controlo positivo e um controlo negativo para avaliar a viabilidade do ensaio. (39)

A observação da lâmina, por microscopia de fluorescência, após a incubação com a amostra do doente, permite a distinção e a caracterização nas diferentes estruturas celulares (nucleoplasma, nucléolos, citoplasma e mitoses). Através desta distinção obtém-se uma hierarquia de padrões de coloração com base na localização. Cada autoanticorpo causa uma fluorescência típica, que está padronizada, dependendo da localização do autoantígeno correspondente. A classificação destes padrões está descrita no Anexo D.

Análises com ANA positivos exigem uma confirmação por métodos mais específicos para que seja possível obter uma quantificação/semi-quantificação através de um título correspondente ao fator de diluição da amostra para o qual a fluorescência específica é identificável. O diagnóstico deve ser feito com base não só no resultado dos autoanticorpos, mas também deve estar de acordo com o quadro clínico do doente.

II. Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos

Os anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) são autoanticorpos direcionados contra antígenos encontrados em grânulos citoplasmáticos de neutrófilos. São marcadores serológicos importantes para o diagnóstico de vasculites autoimunes como: Granulomatose com poliangeíte (GPA), Poliangeíte microscópica (MPA), Granulomatose eosinofílica com poliangeíte (EGPA). (29)

No laboratório de autoimunidade do CHUC, a pesquisa de ANCA é efetuada por IFI e utiliza como substrato, neutrófilos fixados em lâminas com etanol e formalina. O etanol permeabiliza as membranas dos grânulos e permite a migração do conteúdo, já a formalina é um fixador que impede a migração de antígenos para fora dos grânulos. A fixação por dois métodos é útil para a distinção dos diferentes ANCAs em termos de padrão de fluorescência.

Quando observados ao microscópio de fluorescência, os ANCAs podem ter dois aspetos típicos: c-ANCA que é um padrão citoplasmático e p-ANCA que corresponde a um padrão perinuclear. O padrão de fluorescência c-ANCA (Figura 15) é causado principalmente pela Proteinase 3 (PR3) e aparece como uma coloração granular difusa no citoplasma dos neutrófilos. A fluorescência neste padrão é mais intensa no centro da célula e gradualmente mais clara nas bordas externas do citoplasma. Este padrão é muito específico de Granulomatose com Poliangeíte. (40)

No padrão p-ANCA (Figura 15), a fluorescência envolve principalmente os lobos nucleares. É causado por anticorpos contra várias especificidades: mieloperoxidase (MPO),

elastase, lactoferrina, lisozimas, catepsina G, β -glucuronidase que migram para fora dos grânulos após fixação com etanol e são atraídos para o núcleo carregado negativamente. É um padrão muito menos específico e pode ser encontrado em doentes com Poliangeíte Microscópica, Granulomatose com Poliangeíte e outros diagnósticos. (40)

As amostras com resultado positivo no teste inicial por IFI, são confirmadas por imunoenaios específicos de MPO e PR3 por FEIA ou ELISA. Os títulos são úteis para monitorização da atividade da doença.

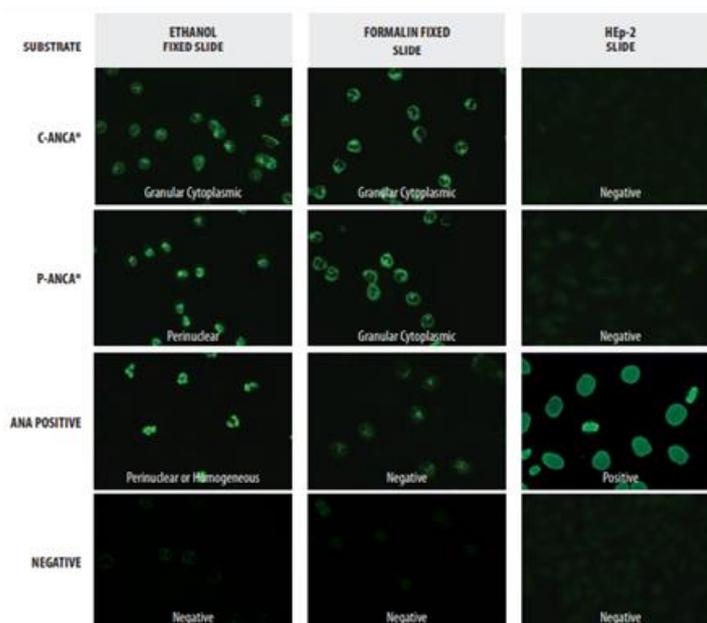


Figura 14 Padrões de fluorescência ANCA (Adaptada de INOVA, 2018)

III. Anticorpos anti-mitocôndrias, Anticorpos anti-músculo liso, Anticorpos anti-micromossomas renais e hepáticos

Nas doenças hepáticas autoimunes os anticorpos anti-mitocôndrias (AMA), os anticorpos anti-músculo liso (ASMA) e os anticorpos anti-micromossomas renais e hepáticos são utilizados como marcadores para classificação, diagnóstico e monitorização da doença. Existem três formas principais de doença autoimune do fígado: Hepatite Autoimune (HAI) tipo 1 e tipo 2, Colangite Biliar primária (CBP) e Colangite Esclerosante primária (CEP). (29)

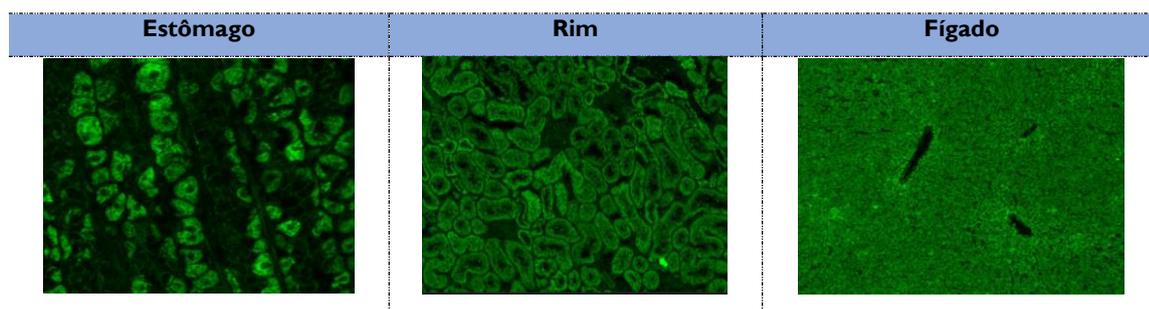
Os ASMA circulantes desempenham um papel fundamental no diagnóstico de HAI. A determinação de ASMA implica a utilização de vários substratos: cortes da mucosa gástrica de rato, células de cultura da aorta de rato (VSM47) e ainda células renais. A presença de autoanticorpos contra epítomos conformacionais de F-actina, que é um marcador muito específico para o tipo I de HAI, o citoesqueleto das células VSM47 apresenta fluorescência

filamentosa, cujo padrão é facilmente identificável e facilita o diagnóstico. No caso da HAI do tipo 2, é comum um título elevado de anticorpos anti- microsomas renais e hepáticos (anti-LKMI) e antígeno anti-citosol do fígado tipo I (anti-LCI). Na pesquisa de Anti-LKMI, é utilizado um substrato de fígado e de rim de rato. Estes anticorpos coram o citoplasma de hepatócitos e tubos proximais renais. (41)

A detecção de AMA é de grande importância no diagnóstico de colangite biliar primária. Os AMAs coram fortemente o citoplasma das células dos túbulos distais que são ricos em mitocôndrias, também coram células parietais gástricas e hepatócitos. Para a aplicação de IFI, utiliza-se como substrato rim de rato. Os anticorpos contra o antígeno M2 são os marcadores de diagnóstico mais sensíveis e específicos. A sua seropositividade é uma ferramenta importante no diagnóstico de CBP e um poderoso preditor do desenvolvimento da função hepática. Além dos AMA, os ANA também pode ser encontrados com frequência em pacientes com colangite biliar primária. A determinação de autoanticorpos anti-pontos nucleares (SPL100 e PML) e autoanticorpos antimembrana nuclear gp210 pode ser de relevância patológica. (41)

Por fim, a colangite esclerosante primária está fortemente associada à presença de autoanticorpos contra granulócitos cujo antígeno alvo é a lactoferrina ligada ao DNA e por isso o seu padrão é semelhante a p-ANCA mas pode também apresentar títulos elevados de ANA. (41)

Tabela 29 Anticorpos anti-mitocondriais num caso de colangite biliar primária (Imagens do CHUC)



3.2.2.2. Quimioluminescência

A quimioluminescência (CLIA) é outra técnica que se aplica para visualizar a formação do complexo antígeno-anticorpo. A produção de energia na forma de luz ocorre devido a uma reação química, normalmente uma reação de oxidação, onde é produzida uma molécula excitada que posteriormente volta ao seu estado fundamental.

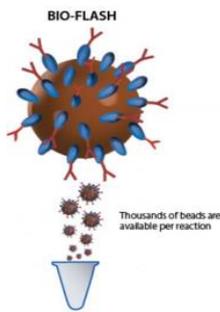


Figura 15 Método de CLIA

O analisador utilizado no laboratório de autoimunidade é o BIO-FLASH e o procedimento por ele executado envolve várias etapas: captura do autoanticorpo de interesse pelo antígeno acoplado às esferas, reconhecimento do autoanticorpo com um novo anticorpo marcado com aminobutiletisoluminol (ABEI) e por fim a medição quimioluminescente. A luz é emitida na presença de H_2O_2 e é medida como um valor numérico expresso em unidade de luz relativa (RLUs). As RLUs são proporcionais à quantidade de ABEI retido pelo complexo e conseqüentemente à quantidade de autoanticorpos que ligam o antígeno alvo ligado covalentemente às esferas. As RLUs são traduzidas para concentração de autoanticorpo pelo equipamento através da obtenção de uma curva de calibração. (42)

É um método base para vários tipos de imunoensaios automatizados, usados para detetar uma ampla gama de substâncias úteis para o diagnóstico clínico. (29)

As aplicações deste método no laboratório de autoimunidade do CHUC passam pela determinação de anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA) associados a doenças reumatológicas, anticorpos anti-membrana basal glomerular associados a vasculites e ainda anticorpos anti-cardiolipinas (IgG e IgM) associados ao Síndrome Antifosfolípido. As determinações feitas por quimioluminescência são utilizadas como rastreio, devendo efetuar-se a confirmação e o doseamento por ELISA.

3.2.2.3. Radioimunoensaio

O radioimunoensaio (RIA) é útil na determinação quantitativa de anticorpos contra DNA de dupla-hélice (dsDNA) em soro humano, característicos em doentes com Lúpus Eritmatoso Sistêmico e anticorpos anti-insulina característicos da Diabetes Mellitus. A determinação da concentração de anticorpos contra dsDNA é importante no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da terapêutica administrada. (28)

RIA é uma técnica simples, mas morosa para a quantificação de anticorpos contra dsDNA no soro, através da medição da capacidade de ligação do dsDNA livre na amostra. O ensaio implica a preparação de soluções padrão, controlo negativo e positivo e ainda a amostra inteira ou diluída. A cada um dos tubos é adicionado dsDNA marcado com ^{125}I , de seguida o conjunto é incubado e posteriormente adiciona-se uma solução de sulfato de amónia para conseguir a separação. Os tubos são centrifugados e o sobrenadante é

cuidadosamente decantado. Por fim os tubos são colocados num contador de cintilações (Wallac Wizard 1470®) e o resultado é obtido por comparação da curva padrão com a curva construída pelas amostras. A capacidade de ligação do dsDNA é proporcional à reatividade detetada. (43, 44)

Os resultados por si só não devem ser considerados diagnóstico final, é preciso correlacionar com outras observações clínicas e testes de diagnóstico.

3.2.2.4. Ensaio Imunoenzimático

Os ensaios imunoenzimáticos são técnicas que se baseiam na formação e deteção de complexos antígeno-anticorpo com recurso a enzimas que se ligam aos anticorpos. A adição de um cromogénio resulta num produto corado que é medido por espectrofotometria.

1. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) podem ter algumas variantes, no entanto as mais comuns são: ELISA direto, ELISA indireto, ELISA sanduíche e ELISA de competição. No laboratório de autoimunidade do CHUC é utilizado o ELISA indireto. Na primeira etapa da reação, as amostras diluídas são incubadas nos poços das microplacas que estão revestidas de antígenos. No caso das amostras serem positivas, os anticorpos específicos presentes na amostra biológica, ligam-se aos antígenos e formam um complexo. Após a incubação, é feita uma lavagem para retirar o excesso de antígeno não ligado. De seguida, é feita uma segunda incubação com um anticorpo marcado com uma enzima. Esta enzima catalisa uma reação de cor e permite a deteção do complexo antígeno-anticorpo formado previamente. A cor resultante é diretamente proporcional à quantidade de autoanticorpos presentes na amostra. A partir de uma curva de calibração é possível obter a concentração de autoanticorpos. (45)

No CHUC, este método é muitas vezes aplicado para pesquisa e identificação de anticorpos anti-histonas, anticorpos anti-LCI e anticorpos anti-Fator Intrínseco. Os equipamentos automatizados, usados para o processamento de amostras por ELISA são: o Analyzer I e o MAGO4.

II. Ensaio Imunoenzimático Fluorescente

A técnica de ensaio imunoenzimático fluorescente (FEIA) é semelhante à técnica de ELISA, no entanto difere no tipo de substrato utilizado e consequentemente, na forma como é realizada a medição.

Neste método o substrato é fluorogénico e permite a deteção do complexo antígeno-anticorpo. A fluorescência resultante é diretamente proporcional à quantidade de autoanticorpos presentes na amostra. A partir de uma curva de calibração, obtém-se a concentração de autoanticorpos presentes na amostra.

No laboratório de Imunologia dos CHUC, esta técnica é utilizada sobretudo para a pesquisa de anticorpos anti-mieloperoxidase (MPO), anticorpos anti-proteinase 3 (PR3) associados às vasculites e anticorpos anti-piruvato desidrogenase (IgG)- M2, associados às colangites mas também se aplica à pesquisa de outros autoanticorpos.

4. Hematologia

O setor da Hematologia é responsável pelo estudo dos elementos constituintes do sangue e da medula óssea com o objetivo de diagnosticar distúrbios hematológicos, monitorizar a progressão da doença e a resposta à terapia.

Os elementos constituintes do sangue incluem eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Os eritrócitos são as células sanguíneas mais numerosas com função relevante no processo respiratório tecidual, uma vez que possuem na sua composição hemoglobina, uma proteína transportadora de oxigénio. Os leucócitos constituem um grupo variado de células com funções imunológicas específicas e aparência morfológica distinta. A população leucocitária inclui: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariócitos da medula óssea que atuam na manutenção da homeostasia. (46)

A fase pré-analítica é muito importante, pelo que a colheita deve ser adequada para que os dados laboratoriais sejam precisos e válidos para a amostra em causa. O tipo de amostra biológica mais utilizada no setor é o sangue total que é colhido por punção venosa para tubos com anticoagulante. Os anticoagulantes utilizados na rotina do laboratório do CHUC são o EDTA para o estudo do hemograma e o citrato para o estudo das plaquetas e da coagulação. Podem também ser analisados fluidos biológicos como LCR, líquidos sinoviais, líquidos peritoneais e amostras de medula óssea em situações infecciosas que indiquem a presença de células estranhas nestes fluidos.

As contagens celulares e o esfregaço de sangue periférico são feitos de forma automática na cadeia do CoreLab onde está incluído um equipamento da Sysmex que fornece dados do hemograma simples ou com leucograma, contagem de reticulócitos e ainda a fórmula plaquetar. O analisador utiliza uma combinação de técnicas para detetar e diferenciar tipos específicos de células, incluindo impedância elétrica, dispersão de luz laser, citometria de fluxo e deteção de fluorescência. Através da citometria de fluxo, é possível detetar populações por expressão de antigénios.

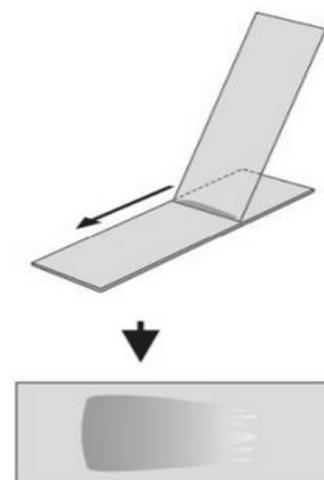


Figura 16 Esfregaço de sangue periférico

O hemograma é a análise de rotina e diagnóstico mais requerida no laboratório do CHUC e permite quantificar e qualificar os diferentes componentes celulares do sangue. Os parâmetros por ele analisados e os valores de referência utilizados no laboratório estão descritos na tabela 31.

Tabela 30 Parâmetros do hemograma com leucograma e respectivos valores de referência utilizados no CHUC

Hemograma	
Parâmetros	Valores de Referência
Série Eritrocitária	
Eritrócitos	3.8 – 4.8 × 10 ¹² /L
Hemoglobina	12.0 – 16.0 g/dL
Hematocrito	36 – 46 %
VCM	83.0 – 101.0 fL
HCM	27.0 – 32.0 pg
CHCM	32.0 – 35.0 g/dL
RDW	11.6 – 14
Série Leucocitária	
Leucócitos	4.0 – 10.0 × 10 ⁹ /L
Neutrófilos	2.0 – 7.0 × 10 ⁹ /L
Linfócitos	1.0 – 3.0 × 10 ⁹ /L
Monócitos	0.2 – 0.5 × 10 ⁹ /L
Eosinófilos	0.0 – 0.5 × 10 ⁹ /L
Basófilos	0.0 – 0.1 × 10 ⁹ /L
Eritroblastos	× 10 ⁹ /L
Plaquetas	150 – 400 × 10 ⁹ /L

5. Casos Clínicos

A. Doente do género masculino, de 39 anos que recorre ao SU a 13/9 por febre sem foco, pico máximo 39°C com 2 dias de evolução. Utente portador de CVC (cateter venoso central). Tem síndrome do intestino curto e cálculos renais já em seguimento. Faz nutrição parentérica total em casa. Com cólicas renais de repetição. Iniciou antibioterapia por via intra-venosa na entrada nas urgências com 1g Vancomicina, 500mg Meropenemo e 1g Paracetamol.

A *Listeria monocytogenes* é um dos agentes etiológicos da meningite bacteriana que consiste num processo inflamatório da pia-aracnóide e do espaço subaracnoideu. Normalmente o aparecimento desta bactéria é mais comum em recém-nascidos até 2 meses ou adultos com mais de 60 anos. Em nenhum dos casos se inclui o doente apresentado. Por outro lado, o síndrome do intestino curto é uma co-morbilidade de imunossupressão que consiste na má absorção resultante da ressecção extensa do intestino delgado. (48)

A avaliação pré-antibioterapia passa pela obtenção de hemoculturas positivas que devem ser estudadas. Neste caso, a amostra positivou 3 dias depois. Começou por se fazer o exame direto onde foi possível observar bacilos de Gram positivo com aspeto característico de *Listeria monocytogenes* (Figura 18) e cultura em placa nos meios de GS e PVX. O crescimento das culturas está demonstrado na Figura 19. As colónias são pequenas, lisas, branco-acinzentadas e produzem uma zona estreita de hemólise. A partir de uma colónia isolada foi feita a identificação e o resultado de *Listeria monocytogenes* foi confirmado.



Figura 17 Exame direto com bacilos Gram positivos com aspeto característico de *Listeria monocytogenes*

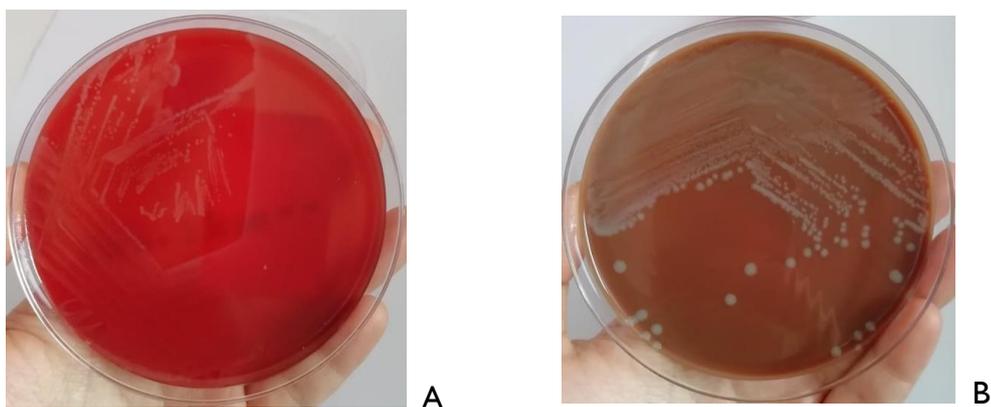


Figura 18 Crescimento bacteriano em culturas. A: Cultura em GS. B: Cultura em PVX

De seguida, procedeu-se à obtenção do antibiograma manual para este microrganismo em meio MHF baseada nos critérios do EUCAST. O resultado está demonstrado na Figura 20.

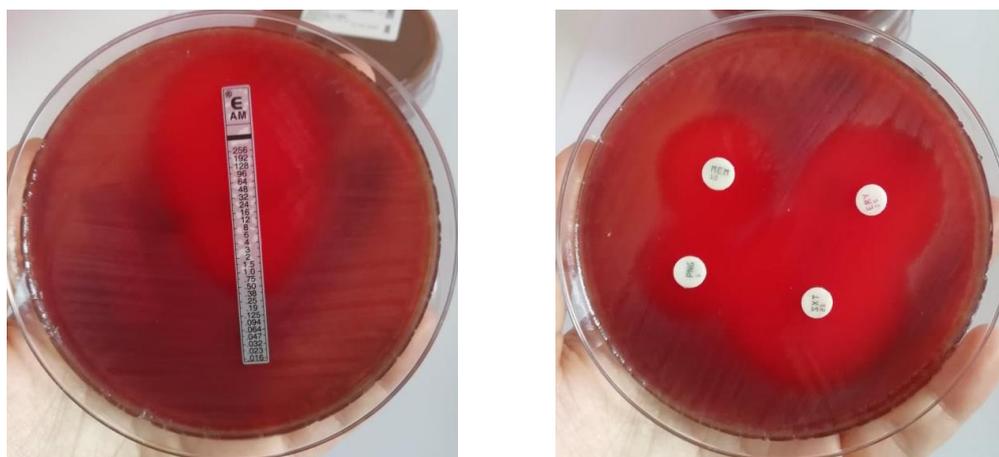


Figura 19 Antibiogramas manuais em e-test e em disco para *Listeria monocytogenes*

Do antibiograma retiraram-se as seguintes conclusões:

- Sensível: Ampicilina, Penicilina, Eritromicina, Trimetoprim/Sulfa
- Resistente: Meropenemo

De acordo com estes resultados houve necessidade de reajustar a terapêutica. Face à co-morbilidade existente o ideal seria que a terapia passasse pela administração de Ampicilina e Gentamicina durante 4 a 6 semanas. (48)

B. Adolescente com 17 anos, com episódios recorrentes de colestase desde o primeiro ano de vida e insuficiência hepática desde os três anos. Tem diagnóstico de hepatite AI tipo 2, estabelecido na sequência de falência hepática aguda que resolveu com terapêutica. Após o episódio inicial mantém seguimento e tem-se mantido estável apesar da progressão cirrótica evidente. Foi submetida a transplante hepático aos 16 anos por hepatite autoimune com evolução cirrótica.

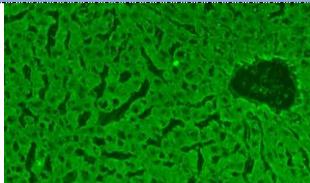
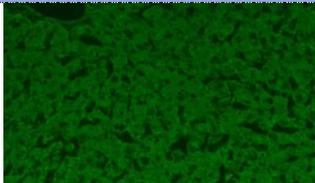
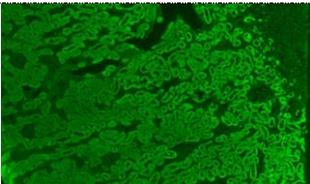
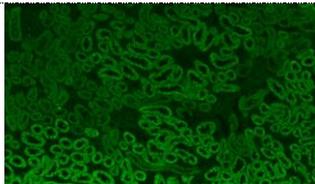
A hepatite autoimune é uma doença hepática inflamatória de causa desconhecida.

O diagnóstico de HAI é feito com base em critérios de diagnóstico definidos pelo Grupo Internacional de Hepatite Autoimune e pode ser distinguida em 2 tipos com base nos autoanticorpos presentes. Dentro dos critérios laboratoriais para o diagnóstico temos: elevação das transaminases e fosfatase alcalina; concentração aumentada de imunoglobulinas totais; presença de anticorpos anti-músculo liso (em específico anti-actina) ou anti-microsomas renais e hepáticos; ausência de positividade para os marcadores de hepatite viral. Os resultados descritos na Tabela 31, demonstram a presença de patologia hepática e ainda a presença de anticorpos anti-LKM, que são critérios que vão de encontro ao diagnóstico de hepatite autoimune. A presença de títulos elevados de LKMI, indica que estamos perante uma hepatite autoimune tipo 2. Este tipo de hepatite autoimune é comum em crianças e pode estar associada a colangite biliar primária e colangite esclerosante primária. (49)

Tabela 31 Resultados iniciais da doente

	Bioquímica	Valores		Autoimunidade	Resultados
27/07/2006	Fosfatase Alcalina	692 (U/L)	01/08/2006	Ac. Anti-nucleares	Negativo
	Gama GT	50 (U/L)		Ac. Anti – LKMI	IgG > 200 (RU/mL)
	AST	1808 (U/L)		Mosaico Hepático	> 1600 (RU/mL) – Positivo Forte
	ALT	2770 (U/L)			
	LDH	1237 (U/L)			

Tabela 32 Resultados obtidos por IFI das análises referentes à autoimunidade

	19/04/2018	10/07/2020
Doenças Autoimunes Sistêmicas		
Ac. Anti-nucleares e citoplasmáticos:	AC -2 com título 1:640	AC -2 com título 1:320 e AC-6 com título 1:640
Ac. Anti-ds-DNA:	Negativo	Negativo
Doenças Hepáticas Autoimunes		
Ac. Anti-Mitocôndriais:	Negativo	-
Ac. Anti-Músculo Liso:	Negativo	-
Ac. Anti-LKM:	Positivo >2560 (RU/mL) com doseamento da IgG >1600 (RU/mL) que é positivo forte	Positivo > 1:1280 com doseamento da IgG 627.6 (RU/mL) que é positivo forte
Mosaico Hepático	Positivo LKM >1280 (RU/mL)	-
Padrões de Fluorescência		
Fígado		
Título	1:160	1:320
Rim		
Título	1:160	1:320

Da análise dos resultados, é de salientar que apesar da positividade ainda ser notória, a diminuição da intensidade de fluorescência, entre as duas análises referidas (sendo uma correspondente a uma fase pré-operatória e outra correspondente a fase pós-operatória), é um resultado satisfatório na medida em que equivale à remissão da doença. Os níveis das transaminases e fosfatase alcalina também normalizaram após o transplante.

Na análise dos ANA, com o substrato HEp-2, é de sublinhar o resultado do citoplasma que apresenta um padrão de fluorescência nuclear finogranular denso. Este padrão apresenta núcleos com granulação irregular com áreas mais densas e áreas menos densas, o que dá a sensação de aspeto rugoso característico. É de referir que no dia 10/07, o padrão apresentou também múltiplos dots nucleares que podem estar associados a Cirrose Biliar Primária. Os anticorpos anti-LKMI, quando revelados por IFI apresentam diferentes padrões de fluorescência: no fígado, a fluorescência é intensa no citoplasma dos hepatócitos e ausente nos núcleos; no rim a fluorescência é intensa, granular e homogénea no citoplasma das células dos túbulos proximais e ausente no citoplasma das células dos túbulos distais.

IV. Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade foi implementado como forma de diminuir erros, que podem alterar os resultados dos exames laboratoriais. Desta forma, pretende aumentar a confiança nos resultados analíticos obtidos para que estes espelhem com fiabilidade o estado clínico do doente.

Na prática, a avaliação externa da qualidade consiste num sistema de amostras de conteúdo conhecido, mas não revelado, que chegam ao laboratório para serem examinadas exatamente da mesma forma que as amostras examinadas na prática habitual do laboratório. Os resultados obtidos são comparados com os resultados esperados enviados pelos programas de controlo. Esta avaliação é feita regularmente através da participação em programas de qualidade interlaboratoriais. Demonstra o desempenho de cada laboratório participante porque trabalha estatisticamente todos os dados recebidos dos diferentes participantes. Tem como principal objetivo a monitorização da qualidade dos testes em benefício dos doentes.

A avaliação interna da qualidade corresponde a uma análise diária efetuada em todos os equipamentos, de uma amostra controlo com valores conhecidos para avaliar a imprecisão dos resultados. Quando há alguma alteração significativa, são implementadas medidas de correção de forma a minimizar ou eliminar a interferência. A partir deste controlo é possível reunir condições para a monitorização e avaliação do processo analítico.

Todos os setores do serviço de patologia clínica do CHUC são submetidos a programas de controlo externo de qualidade como: United Kingdom External Quality Assessment Service (UKNEQAS), Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS) e External Quality Assurance Services (EQAS).

V. Conclusão

Este relatório é o culminar de um trabalho exigente, mas enriquecedor, desenvolvido ao longo do Mestrado em Análises Clínicas. A realização deste estágio foi uma mais-valia para a minha formação académica e profissional, mas também a nível de evolução pessoal, ao integrar uma equipa de trabalho competente que me transmitiu todos os conhecimentos possíveis, bem como à aplicação dos conhecimentos que adquiri neste mestrado, aplicando-os à prática laboratorial.

Esta experiência permitiu-me ter uma visão global da rotina laboratorial num contexto real de trabalho. Foi um privilégio estagiar num local como é o CHUC, que recebe uma grande diversidade de amostras e utentes, para além de poder trabalhar com uma equipa variada de profissionais de saúde. As relações interpessoais e a boa comunicação entre setores é, imprescindível para o bom funcionamento do laboratório.

Em suma, penso que os objetivos propostos foram atingidos. Saí deste estágio com uma visão mais crítica, que me faz questionar a validade dos resultados, correlacionando as diferentes áreas. Apesar das dificuldades impostas pelos tempos em que vivemos, todo o percurso foi feito com muita força de vontade, empenho e persistência.

VI. Bibliografia

1. MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C. - **Textbook of diagnostic microbiology, Sixth edition.** 6th. Ed. [S.l.] : Elsevier, 2019.
2. LEVINSON, Warren; - **Review of Medical Microbiology and Immunology, Fourteenth Editions.** 14th. Ed. [S.l.]; LANGE, 2016
3. MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; e PFALLER, Michael A. – **Microbiologia Médica, Seventh Edition.** 7th. Ed. [S.l.] : Elsevier Ltd, 2014.
4. NESTER, Eugene W.; ANDERSON, Denise G.; ROBERTS, C. Evans; e NESTER, Martha T. – **Microbiology: A Human Perspective, Sixth Edition.** 6th. Ed. [S.l.]; Quebecor World Dubuque, IA, 2008
5. WILLEY, Joanne M.; SHERWOOD, Linda M.; e WOOLVERTON, Christopher J. – **Prescott's Microbiology.** 9th. Ed. [S.l.] : Mc Graw Hill, 2014
6. CAPPUCINO, James G.; e SHERMAN, Natalie - **Microbiology: A Laboratory Manual.** 10th. Ed. [S.l.]: Pearson, 2014.
7. FONSECA, Bruschy Ana; SEBASTIÃO, Clotilde; MARTINS, Filomena; RIBEIRO, Maria; CALHEIROS, Ismália; LITO, Luís; ABECASSIS, Margarida; PINTO, Margarida; SPENCER, Maria; PINHEIRO, Maria; COSTA, Maria; BARROS, Rosa; BENTO, Rosa - **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia.** [S.l.]: Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA), 2004.
8. CARROLL, KAREN C.; BUTEL, Janet S.; MORSE, Stephen A.; MIETZNER, Timothy - **Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology.** 27th. Ed. [S.l.] : McGraw-Hill Education, 2016
9. TILLE, Patricia M. – **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 14h. Ed. [S.l.] : Elsevier Ltd, 2017
10. ZIMBRO, Mary Jo; POWER, David A.; MILLER, Sharon M.; WILSON, George E.; e JOHNSON, Julie A. - **Difco & BBL Manual : Manual of microbiological Culture Media.** 2nd. Ed. [S.l.] : BD diagnostics, 2009.
11. VITEK® MS | bioMérieux Portugal - [Consulta. 14 de maio de 2020]. Disponível em www.biomerieux.pt/produto/vitek-rs-ms-0.
12. ULRICH, M.P; CHRISTENSEN, D. R.; COYNE, S. R.; CRAW, P. D.; HENCHAL, E. A.; SAKAI, S. H.; SWENSON, D.; THOLATH, J.; TSAI, J.; WEIR, A. F.; NORWOOD, D. A. –

- Evaluation of the Cepheid GeneXpert system for detecting Bacillus anthracis.**
Journal of Applied Microbiology. 100 (2006), 1011-1016
13. LIMA, Taiza M.; BELOTTI, Naiara C.; NARDI, Susilene M.; PEDRO, Heloisa - **Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose.**
Revista Pan-Amazônica de Saúde. 8, 2 (2017), 67-78
14. MANDIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel H.; e STAHL, David A. – **Brock Biology of Microorganisms.** 14th. Ed. [S.l.] : Pearson, 2015
15. CHARNOT-KATSIKAS, Angella; TESIC, Vera; LOVE, Nedra; HILL, Brandy; BOONLAYANGOOR, Sue; BEAVIS, Kathleen G. – **Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow.** Journal of Clinical Microbiology. 56, 1 (2018), e001166-17
16. SCHROTTNER, Percy; RUDOLPH, Wolfram W.; BERTRAM, Sebastian; GUNZER, Florian - **Comparison of VITEK2, MALDI-TOF MS, and 16S rDNA sequencing for identification of Myroides odoratus and Myroides odoratimimus.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 79 (2014), 155-159
17. GOERING, Richard V.; DOCKRELL, Hazel M.; ZUCKERMAN, Mark; CHIODINI, Peter L. - **Mims' medical microbiology and immunology.** 6th. Ed. Edinburgh : Elsevier, 2019
18. VANDEPITTE, J; WORLD HEALTH ORGANIZATION. - **Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology.** 2nd. Ed. [S.l.] : World Health Organization, 2003
19. **Sistemas de Detecção Microbiana BACT/ALERT® 3D Visão Geral | bioMérieux Portugal** - [Consulta. 26 de mar. de 2020]. Disponível em www.biomerieux.pt/produto/sistemas-de-detecao-microbiana-bactalertr-3d-visao-geral.
20. TORTOLI, Enrico; CICHERO, Paola; PIERSIMONI, Claudio; SIMONETTI, M. Tullia; GESU, Giampietro; NISTA, Domenico - **Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study.** Journal of Clinical Microbiology. 37, 11 (1999), 3578-3582
21. MARSHALL, William J.; LAPSLEY, Marta; DAY, Andrew P.; AYLING, Ruth M.- **Clinical biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.** 3rd. Ed. Edinburgh : Elsevier Limited, 2014
22. HAIN LIFESCIENCE – **DNA•STRIP® technology** (2016) [Consulta. 2 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/technologies/dnastrip.html>

23. HAIN LIFESCIENCE – GenoType Mycobacterium AS | **Detection and differentiation of clinically relevant NTM** (2017). [Consulta. 2 de out. de 2020]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-as.html>
24. HAIN LIFESCIENCE – GenoType Mycobacterium CM | **Detection and differentiation of clinically relevant NTM** (2017). [Consulta. 2 de out. de 2020]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-cm.html>
25. HAIN LIFESCIENCE – GenoType MTBDRplus | **Detection resistance to rifampicin and/or isoniazid of MTBC complex** (2017). [Consulta. 2 de out. de 2020]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtldrplus.html>
26. MURPHY, Kenneth - **Imunobiologia de Janeway**. 8th. Ed. Santana : ARTMED EDITORA LTDA, 2014
27. ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv - **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª. Ed. [S.l.] : Elsevier Editora Ltda, 2015
28. OWEN, Judith A.; PUNT, Jenni; STRANFORD, Sharon A.; JONES, Patricia P. - **Kuby immunology**. 7th. Ed. New York : W.H. Freeman, 2013
29. STEVENS, Christine Dorresteyn; MILLER, Linda E - **Clinical immunology and serology**. 4th. Ed. Philadelphia : F.A. Davis Company, 2017
30. NORDIN, Fatimah D.; KHALID, Mohd; AZIZ, Siti; BAKRI, Nor; RIDZUAN, Siti; JALIL, Julaina; HABIB, Anasufiza; YAKOB, Yusnita - **Performance comparison of EasyFix G26 and HYDRASYS 2 SCAN for the detection of serum monoclonal proteins**. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 34 (2020)
31. KEREN, DAVID F. - **Protein electrophoresis in clinical diagnosis**. [S.l.] : Arnold, 2003
32. CHERNECKY, Cynthia C; BERGER, Barbara J - **Laboratory tests and diagnostic procedures**. 5th. Ed. St. Louis, Mo. : Saunders Elsevier, 2008
33. RICH, Robert R.; FLEISHER, Thomas A.; SHEARER, William T.; SCHROEDER, Harry W.; FREW, Anthony J.; WEYAND, Cornelia M. - **Clinical immunology: Principles and Practice**. 3rd. ed. China : Elsevier Limited, 2008

34. WANG, Lifeng; WANG, Fu-Sheng; GERSHWIN, M. Eric – **Human autoimmune diseases: a comprehensive update.** Journal of INTERNAL MEDICINE. 278, (2015), 369-395
35. HANG, LeMong; NAKAMURA, Robert M. – **Current Concepts and Advances in Clinical Laboratory Testing for Autoimmune Diseases.** Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 34,3 (1997), 275-311
36. PERL, Andras - **Autoimmunity Methods and Protocols.** 2nd. ed. New York : Humana Press, 2012
37. STORCH, Wulf - **Immunofluorescence in clinical immunology.** 1st. ed. Basel : Birkhäuser Verlag, 2000
38. AGMON-LEVIN, Nancy et al. - **International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies.** Annals of the Rheumatic Diseases. 73 (2014), 17-23
39. RAMOS, TERESA - **AUTOIMUNIDADE: Enquadramento e abordagem laboratorial** (2017) [Consulta. 28 de set. de 2020]. Disponível em: repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4824/1/AUTOIMUNIDADE.pdf
40. RADICE, A.; SINICO, R. A – **Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA).** Autoimmunity. 38, 1 (2005), 93-103
41. BOGDANOS, Dimitrios P.; INVERNIZZI, Pietro; MACKAY, Ian R.; VERGANI, Diego – **Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges.** World J Gastroenterol. 14, 21 (2008), 3374-3387
42. MAHLER, Michael; BENTOW, Chelsea; SERRA, Josep; FRITZLER, Marvin J. – **Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies.** Immunopharmacology and Immunotoxicology. 38,1 (2016) 14-20
43. WASMUTH, J.; GRUN, B.,; TERJUNG, B.; HOMRIGHAUSEN, A.; SPENGLER, U. - **ROC analysis comparison of three assays for the detection of antibodies against double-stranded DNA in serum for the diagnosis of systemic lupus erythematosus.** Clinical Chemistry. 50,11 (2004), 2169-2171.
44. SHOENFELD, Yehuda; MERONI, Pier-Luigi; GERSHWIN, M. Eric - **Autoantibodies.** 3rd. ed. [S.l.] : Elsevier, 2014
45. VAN EMON, Jeanette M - **Immunoassay and other bioanalytical techniques.** Boca Raton : CRC Press, 2007
46. BAIN, BARBARA J - **Blood Cells A Practical Guide.** 5th. Ed. [S.l.] : Wiley-Blackwell, 2015

47. Doenças Autoimunes - **Atlas Imunofluorescência** (Autoimmune Diseases - Immunofluorescence Atlas) [Consulta. 4 de out. de 2020]. Disponível em <http://chobela.blogspot.com>
48. TERAPÊUTICA ANTIBIÓTICA DA MENINGITE - [Consulta. 20 de set. de 2020]. Disponível em www.gis.pt/Ficheiros/Manuais/MA_Meningite.pdf.
49. AIZAWA, Yoshio; HOKARI, Atsushi – **Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects**. Clinical and Experimental Gastroenterology. 10 (2017), 9-18
50. ANA Patterns - **International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns**. [Consulta. 13 de out. de 2020]. Disponível em: <https://www.anapatterns.org/index.php>

ANEXOS

ANEXO A - Fluxo de Amostras do CoreLab

As amostras chegam à recepção do CoreLab provenientes dos polos laboratoriais HP e HG, internamentos, consultas hospitalares e colheitas efetuadas na sala de colheitas do polo HUC. À chegada, as amostras, são integradas, etiquetadas e rastreadas numa rack Indexor.

As amostras são introduzidas na cadeia automática através dos módulos IOM (entrada para amostras urgentes) ou Bulk. As análises associadas aos tubos de colheita são distinguidas informaticamente pela extensão numérica no código de barras que identifica a requisição ou marcação eletrónica. Há amostras que não são totalmente processadas na cadeia e passam por outros equipamentos. A garantia da realização dos pedidos de análises só pode ser atingida através da correta extensão de tubo associada à análise. De outra forma, os sistemas de automatização não conseguem encaminhar a análise ao seu destino de execução.

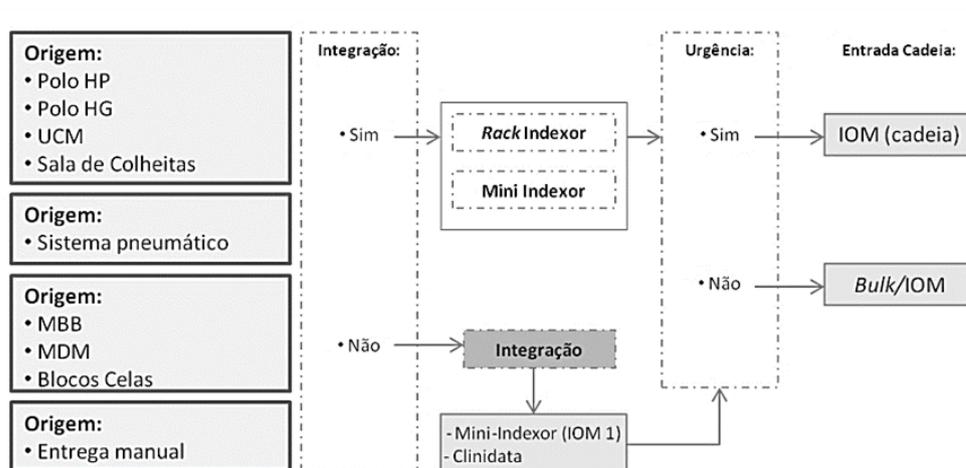


Figura 20 Fluxo da origem das amostras no CoreLab

Em termos de cadeia, as análises são maioritariamente processadas em tubo de soro, com exceção dos parâmetros BNP e Pro-GPR que são processados em tubo de EDTA; Renina Ativa que é processada em EDTA com plasma à temperatura ambiente; Paratormona, Amoníaco, Homocisteína e ACTH são processados em EDTA com plasma gelado;

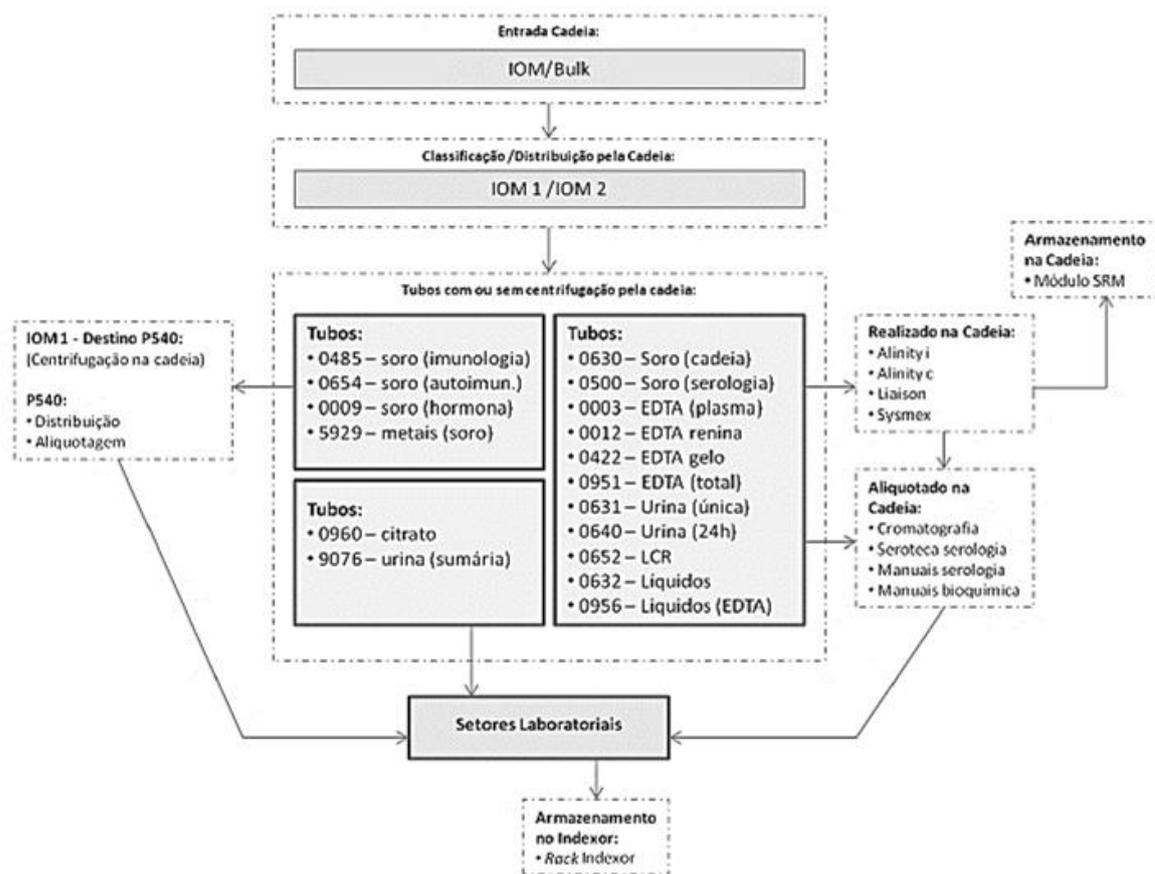


Figura 21 Fluxo das principais extensões de tubos no *CoreLab*

Os tubos primários das amostras processadas ficam armazenados no módulo de refrigeração da cadeia com possível recolha para re-análise e/ou eliminação automáticas, sem necessidade de intervenção.

ANEXO B - Equipamentos do Laboratório de Patologia Clínica do CHUC

➤ Laboratório de Urgência:

Tabela 33 Equipamentos existentes no laboratório de Urgência

Laboratório de Urgência	
ACCELERATOR α3600 (Abbott Diagnostics)	Distribuidor de amostras com centrífuga
ACCELERATOR ρ540 (Abbott Diagnostics)	Alíquotador de amostras para Imunologia, Autoimunidade, Serologia
Alinity c (Abbott Diagnostics)	Analisador por fotometria, potenciometria
Alinity i (Abbott Diagnostics)	Analisador por quimioluminescência
RAPIDPoint 500 (Siemens Healthcare)	Analisador de amostras com determinação de gases sanguíneos, eletrólitos, metabolitos e co-oxímero através de metodologias de potenciometria, amperometria e espectrofotometria

➤ Laboratório de Bioquímica:

Tabela 34 Equipamentos existentes no laboratório de Bioquímica complementares aos existentes no *CoreLab*

Laboratório de Bioquímica	
Aution Max AX-4030 (Arkray)	Analisador para sumária de urina, por tira teste, por espectrofotometria de refletância
Aution Max AX-4280 (Arkray)	Analisador de sedimentos urinários por citometria de fluxo fluorescente
Bio-Rad VARIANT II (Bio-Rad)	Analisador de HbA1c por HPLC
Minicap (Sebia)	Analisador de HbA1c por eletroforese capilar
SENTIFIT 270 (Sysmex)	Analisador imuniquímico para pesquisa de sangue oculto nas fezes por determinação de Hb humana

➤ **Laboratório de Microbiologia:**

Tabela 35 Equipamentos existentes no laboratório de Bacteriologia

Laboratório de Bacteriologia	
BACT/ALERT® 3D (bioMérieux SA)	Detetor de metabolismo microbiano em hemoculturas por redução do teor de oxigênio contido nos tubos através de um método fluorescente.
VITEK® MS (bioMérieux SA)	Identificação microbiana por espectrometria de massa que utiliza tecnologia de MALDI-TOF
VITEK 2® (bioMérieux SA)	Sistema automatizado para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos
GeneXpert® (Cepheid)	Sistema de identificação de microrganismos através de EIA ou Imunoensaio
Accelerate Pheno™ (Accelerate Diagnostics)	Deteção de microrganismos e obtenção de TSA por FISH

Tabela 36 Equipamentos existentes no laboratório de Micobacteriologia

Laboratório de Micobacteriologia	
BD BACTEC™ MGIT™ 960 (BD Diagnostics)	Detetor de metabolismo microbiano por redução do teor de oxigênio contido nos tubos através de um método fluorescente
BACTEC™ 9120™ (BD Diagnostics)	Desenvolvido para detetar o crescimento de microrganismos em amostras de sangue e líquidos com uma metodologia é baseada na deteção da fluorescência

➤ **Laboratório de Imunologia:**

Tabela 37 Equipamentos existentes no laboratório de Imunologia

Laboratório de Imunologia	
Optilite (Binding Site)	Analizador de amostras de soro e urina por turbidimetria (é um processo de medição da perda de intensidade da luz transmitida graças ao efeito de difusão das partículas em suspenso)
Phadia 250 (ThermoFisher Scientific)	Analizadores de IgE por Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)
Hydrasys 2 e Hydrasys 2 SCAN FOCUSING	Analizadores semiautomáticos de eletroforese de proteínas em gel de agarose
BN ProSpec (Siemens Helthcare)	Analizadores de amostras de soro e urina por neflometria (medição da intensidade da luz espalhada em um ângulo fixo de 13 - 24 graus)

Tabela 38 Equipamentos existentes no laboratório da Autoimunidade

Laboratório de Autoimunidade	
BIO-FLASH® (Inova Diagnostics)	Analisador de amostras de soro por quimioluminescência (CLIA)
QUANTA-Lyser 3000® (Inova Diagnostics)	Analisador de amostras de soro por Imunoensaio enzimático (ELISA)
MAGO 4® (Diamedix)	Analisador de amostras de soro por Imunoensaio enzimático (ELISA) e Imunofluorescência Indireta (IFI)
ImmunoCAP250® (ThermoFisher Scientific)	Analisador de amostras de soro por Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)
Analyzer I® (Euroimmun)	Analisador de amostras de soro por Imunoensaio enzimático (ELISA)
IF Sprinter® (Euroimmun)	Analisador de amostras de soro por Imunofluorescência Indireta (IFI)
EUROBlotONE® (Euroimmun)	Analisador de amostras de soro por Immunoblotting
EUROPattern® (Euroimmun)	Sistema automatizado de microscopia para aquisição de imagens de imunofluorescência indireta (IFI) de diferentes substratos; Software de gestão de informação EUROLabOffice
Wallac Wizard I470® Automatic Gamma Counter (PerkinElmer)	Sistema automatizado para contagem de radiação gama

➤ **Laboratório de Hematologia:**

Tabela 39 Equipamentos existentes no laboratório de Hematologia complementares aos existentes no *CoreLab*

Laboratório de Hematologia	
ACL TOP 700 (Werfen)	Analisadores hematológicos por métodos coagulométricos, cromogénicos ou turbidimétricos
Automated Digital Cell Morphology Analyzer DI-60 (Sysmex)	Analisador morfológico digital das células sanguíneas que integra a preparação e coloração dos esfregaços de sangue
Automated Hematology Analyzer XN series (Sysmex)	Analisador hematológico por citometria de fluxo fluorescente, luz dispersa frontal e fluorescência lateral
Tromboelastógrafo ROTEM (Tem Innovations GmbH)	Tromboelastografia rotacional para obtenção de testes viscoelásticos
VES-MATIC CUBE 30	Analisador de velocidade de hemossedimentação automático

ANEXO C - Valores de Referência*

Tabela 40 Valores de Referência dos parâmetros bioquímicos

Bioquímica			
Parâmetros	Valores de Referência	Parâmetros	Valores de Referência
Glicose	60 – 109 (mg/dL) 3.3 – 6.0 (mmol/L)	Ferritina (ng/mL)	30 – 300 (ng/mL)
Azoto Ureico	6.9 - 20.9 (mg/dL) 1.3 – 3.5 (mmol/L)	Ferro	60 – 180 (µg/dL)
Creatinina	0.72 – 1.18 (mg/dL) 63.65 – 104.31 (µmol/L)	Cap. Fix Ferro Disp.	155 – 355 (µg/dL)
Sódio	136 – 146 (mmol/L)	Cap. Total Lig. Ferro	250 – 400 (µg/dL)
Potássio	3.5 – 5.1 (mmol/L)	Sat. Transferrina	20 – 40 (%)
Cloro	101 – 109 (mmol/L)	Ácido Fólico	> 3.5 (ng/mL)
Cálcio	8.8 – 10.6 (mg/dL) 2.2 – 2.6 (mmol/L)	Vitamina B12	187 – 883 (pg/mL)
Osmolalidade	260 – 302 (mOSM/Kg)	Magnésio	1.5 – 2.2 (mg/dL)
Proteínas Totais	6.6 – 8.3 (g/dL) 66.0 – 83.0 (g/L)	Fósforo	4.3 – 6.8 (mg/dL)
Albumina	3.5 – 5.2 (g/dL) 35.0 – 52.0 (g/L)	Colesterol Total	< 190 (mg/dL)
LDH	< 248 (U/L)	Colesterol HDL	> 60 (mg/dL)
AST	< 35 (U/L)	Colesterol LDL	< 110 (mg/dL)
ALT	< 45 (U/L)	Triglicerídeos	< 150 (mg/dL)
Fosf. Alcalina	30 – 120 (U/L)	HbA1c	1.0 – 6.0 (%) 20 – 42 (mmol/mol)
Gama GT	< 55 (U/L)		
Bilirrubina Total	0.2 – 1.2 (mg/dL) 3.4 – 20.5 (µmol/L)		
Bilirrubina Direta	< 0.5 (mg/dL) < 8.6 (µmol/L)		
CK	< 171 (U/L)		
Prot. C Reativa	< 0.50 (mg/dL)		
Alfa amilase	25 - 125 (U/L)		
Lipase	7 – 39 (U/L)		
Procalcitonina	< 0.5 (ng/mL)		

* Os valores de referência variam com a idade, sexo e raça.

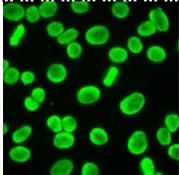
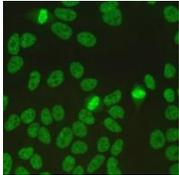
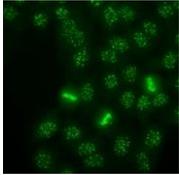
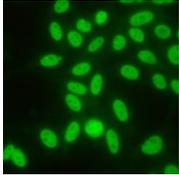
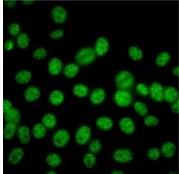
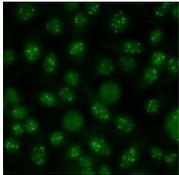
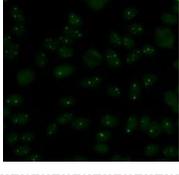
Tabela 41 Valores de referência dos parâmetros hematológicos

Hematologia			
Citometria		Hemostase	
Parâmetros	Valores de Referência	Parâmetros	Valores de Referência
Eritrócitos	4.50 – 5.50 ($\times 10^{12}/L$)	TP	9.4 – 12.5 (seg)
Hemoglobina	13.0 – 17.5 (g/dL)	Protrombinémia	70 – 120 (%)
Hematócrito	40.0 – 50.0 (%)	TPPA	23.4 – 35.4 (seg)
VCM	83.0 – 101.0 (fL)	Ratio	0.81 – 1.19
HCM	27.0 – 32.0 (pg)		
CHCM	32 – 35 (g/dL)		
RDW	11.6 – 14		
Plaquetas	150 – 400 ($\times 10^9/L$)		
Leucócitos	4.0 – 10.0 ($\times 10^9/L$)		
Neutrófilos	2.0 – 7.0 ($\times 10^3/\mu L$)		
Linfócitos	1.0 – 3.0 ($\times 10^3/\mu L$)		
Monócitos	0.2 – 1.0 ($\times 10^3/\mu L$)		
Eosinófilos	0.0 – 0.5 ($\times 10^3/\mu L$)		
Basófilos	0.0 – 0.1 ($\times 10^3/\mu L$)		

ANEXO D - Padrões de Fluorescência obtidos por IFI

De seguida são apresentados os padrões nucleares, citoplasmáticos e mitóticos que aparecem mais frequentemente no laboratório do CHUC.

Tabela 42 Padrões de fluorescência nucleares

Padrão	Descrição	Antígenos	Doenças Associadas
AC-1 - Nuclear homogéneo	 Fluorescência homogénea e regular por todo nucleoplasma. Os nucléolos podem ser corados ou não, dependendo do substrato celular. Células em mitose (metafase, anafase e télofase) com cromatina corada intensamente de modo hialino homogéneo.	dsDNA, nucleossomas e histonas	LES, LES induzido por drogas, Artrite Idiopática Juvenil
AC-2 - Nuclear finogranular denso	 Padrão finogranular observado nos núcleos das células em interfase, com características heterogéneas em relação ao tamanho, brilho e distribuição dos grânulos. Os núcleos apresentam granulação irregular com áreas mais densas e entremeadas a áreas menos densas, gerando aspecto levemente rugoso característico do padrão. A placa metafásica apresenta padrão granular com destaque para grânulos grosseiros característicos.	DFS70/LEDGF	Geralmente não associado a doença autoimune sistêmica; raramente pode ser observado na Síndrome de Sjögren, Esclerose Sistêmica e LES
AC-3 - Centrômero	 Pontos grosseiros distintos nas células em interfase e alinhados na placa de cromatina nas células em mitose.	CENP-A/B	Esclerose Sistêmica forma cutânea limitada, Cirrose Biliar Primária
AC-4 - Nuclear finogranular	 Fluorescência granular de aspecto fino em todo o nucleoplasma. Os nucléolos podem ser corados ou não. Células em mitose (metafase, anafase e télofase) apresentam placa não fluorescente. Ex. anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La.	SS-A/Ro, SS-B/La, Mi-2, Ku	Síndrome de Sjögren, LES, Dermatomiosite
AC-5 - Nuclear Mosqueado	 Nucleoplasma totalmente granular grosseiro pontilhado com pontos grosseiros. Os nucléolos podem ser corados ou não. Células em mitose (metafase, anafase e télofase) apresentam cromatina não fluorescente.	RNP, Sm, RNA polimerase III	Doença Mista do Tecido Conjuntivo, LES, Esclerose Sistêmica
AC-6 - Múltiplos dots nucleares	 Dots nucleares contáveis (6 a 20 pontos por célula)	Sp-100, proteínas PML	Cirrose Biliar Primária, Doenças Autoimunes Reumáticas Sistêmicas, Dermatomiosite
AC-7 - Raros dots nucleares	 Dots nucleares isolados (1 a 6 pontos por célula na maioria das células).	SMN	Síndrome de Sjögren, LES, Esclerose Sistêmica, Polimiosite, indivíduos assintomáticos

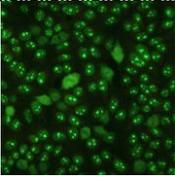
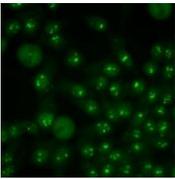
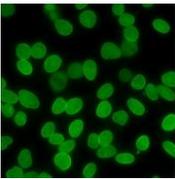
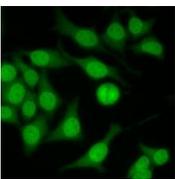
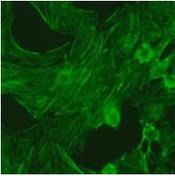
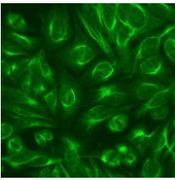
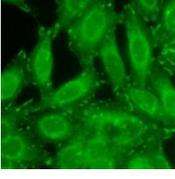
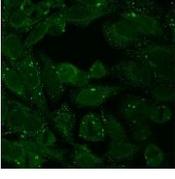
AC-8 - Nucleolar homogêneo		Fluorescência difusa de todo o nucléolo sem fluorescência da placa metafásica cromossômica.	PM/Scl-75, PM/Scl-100	Esclerose Sistêmica, Síndrome de sobreposição Esclerose Sistêmica/Polimiosite
AC-10 - Nucleolar pontilhado		Nucléolos das células em interfase com aspecto pontilhado. Placa cromossômica das células em metafase com até 5 pares de pontos isolados brilhantes na região organizadora dos nucléolos (NOR). O citoplasma das células em mitose pode se apresentar moderadamente positivo.	RNA polimerase I, NOR-90	Esclerose Sistêmica, Síndrome de Sjögren
AC-11 - Membrana nuclear		Coloração homogênea do núcleo com grande intensidade da membrana nuclear sem marcação da placa cromossômica durante a metafase e anáfase. Observa-se acentuação característica da fluorescência nos locais de contato de células adjacentes.	Proteínas associadas às lâminas	LES, Síndrome de Sjögren, Artrites seronegativas
AC-12 - Complexo Poro-nuclear		O envelope nuclear das células em interfase apresenta fluorescência descontínua característica, com acentuação da fluorescência nos pontos de contato entre células adjacentes. Não se verifica decoraçã da placa metafásica das células em metafase e anáfase.	Proteínas do complexo do poro nuclear	Cirrose Biliar Primária

Tabela 43 Padrões de fluorescência citoplasmáticos

Padrão	Descrição	Antigénios	Doenças Associadas
AC-15 - Citoplasmático filamentoso linear	 Padrão caracterizado por coloração das fibras do citoesqueleto ocasionalmente com depósitos granulares pequenos e descontínuos. Fluorescência característica dos filamentos estriados de actina caracterizando eixos longitudinais na célula.	Actina, Miosina não muscular	Doença Mista do Tecido Conjuntivo, Hepatite Crônica Ativa, Cirrose Hepática, Miastenia Gravis, Doença de Crohn, Cirrose Biliar Primária, hemodiálise de longo prazo, raro em Doenças Autoimunes Reumáticas Sistêmicas
AC-16 - Citoplasmático filamentoso fibrilar	 Coloração dos microtúbulos e filamentos intermediários com fluorescência espalhando-se a partir do contorno da membrana nuclear.	Vimentina, citoqueratina, tropomiosina	Condições infecciosas ou inflamatórias, hemodiálise a longo prazo, doença alcoólica do fígado, Doenças Autoimunes Reumáticas Sistêmicas, Psoríase e controles normais
AC-17 - Citoplasmático filamentoso segmentar	 Fluorescência característica de curtos segmentos citoplasmáticos (corpos densos) ao longo das fibras de stresse.	Alfa-actinina, Vinculina	Miastenia gravis, Doença de Crohn, Colite Ulcerativa
AC-18 - Citoplasmático granular (grânulos isolados)	 Fluorescência dos corpos GW citoplasmáticos nas células em interfase, altamente expressos nas fases S/G2 tardias.	GW182	Cirrose Biliar Primária, Doenças Autoimunes Reumáticas Sistêmicas, condições neurológicas e autoimunes

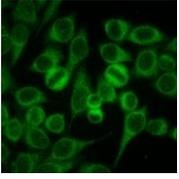
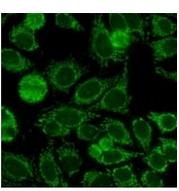
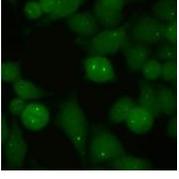
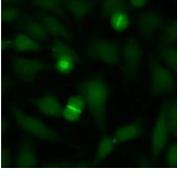
<p>AC-20 - Citoplasmático finogranular denso</p>		<p>Pontos pequenos e dispersos ao longo do citoplasma de aspecto homogêneo ou finogranular denso</p>	<p>Jo-1</p>	<p>Polimiosite/Dermatomiosite, Esclerose Sistêmica forma limitada, Efusão pleural idiopática</p>
<p>AC-21 - Citoplasmático finogranular sugestivo de AMA</p>		<p>Coloração granular grosseira estendendo-se a partir do citoplasma. Ex. anticorpos antimitocôndria</p>	<p>PDC-E2/M2</p>	<p>Cirroze Biliar Primária, Esclerose Sistêmica, raro em outras Doenças Autoimunes Reumáticas Sistêmicas</p>

Tabela 44 Padrões de fluorescência mitóticos

Padrão	Descrição	Antígenos	Doenças Associadas	
<p>AC-24 - Centrossoma</p>		<p>Reatividade dos centriolos (1-2 / célula) no citoplasma e nos polos do fuso mitótico</p>	<p>Pericentrina, Nineína, cCep2250, Cep110</p>	<p>Raro na Esclerose Sistêmica, Fenômeno de Raynaud, infecções (viral e micoplasma)</p>
<p>AC-27 - Ponte intercelular (midbody)</p>		<p>Coloração do corpo intercelular que liga as células irmãs na fase final da divisão celular antes da separação das células filhas.</p>	<p>-</p>	<p>Raro na Esclerose Sistêmica, Fenômeno de Raynaud, neoplasia</p>