



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Liliana Maria Monteiro Correia

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e pelo Dr. António Fernandes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Liliana Maria Monteiro Correia

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e pelo Dr. António Fernandes e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

SETEMBRO DE 2023

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. António Fernandes por me ter recebido neste estágio, por todos os conhecimentos transmitidos, pela ajuda, compreensão e todos os conselhos.

A toda a restante equipa técnica do Laboratório Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu, agradeço por me fazerem sentir integrada na equipa, pelos conhecimentos, conselhos, acompanhamento e ajuda prestados. Um especial agradecimento à Isabel, à Flávia, à Adriana, à Marta e à Sandra, que permitiram que todo o processo fosse ainda mais emocionante através da cumplicidade criada.

Agradeço à Professora Doutora Bárbara da Silva Rocha por toda a disponibilidade e orientação prestadas ao longo da elaboração deste relatório.

Quero também expressar o meu eterno agradecimento à minha mãe, pois sem o seu esforço nunca teria sido possível progredir na minha formação académica. Agradeço toda a força, apoio e motivação, que permitiram manter-me focada no caminho para alcançar os meus objetivos.

Agradeço ao meu irmão e aos meus avós, por me acompanharem ao longo de todo o meu percurso académico, pelo apoio e por acreditarem sempre em mim.

Aos amigos de sempre e aqueles que o Mestrado me deu, pelos momentos partilhados e apoio ao longo deste percurso.

A todos, que direta ou indiretamente tornaram isto possível, obrigada!

Índice

Agradecimentos.....	3
Índice.....	5
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Caraterização do Laboratório de Estágio.....	9
Controlo de Qualidade.....	10
a) Controlo de Qualidade Interno (CQI).....	11
b) Avaliação Externa de Qualidade (AEQ).....	11
Microbiologia.....	12
a) Identificação e Suscetibilidade Antimicrobiana.....	12
b) Produtos Biológicos.....	16
Urina.....	16
Fezes.....	18
Exsudado Vaginal.....	19
Exsudado Uretral.....	20
Sangue: Hemocultura.....	22
Infeções Trato Respiratório Superior.....	23
Infeções Trato Respiratório Inferior.....	24
Infeções Auriculares.....	25
Caso Clínico	26
Imunologia.....	28
Bioquímica.....	30
a) Parâmetros Bioquímicos.....	31
b) Equilíbrio Hidroeletrólítico.....	33
Sódio.....	33
Potássio.....	34
Cloreto.....	34
c) Metabolismo Lipídico.....	35
Colesterol-Total (COL-T).....	35
HDL-C (high density lipoprotein).....	36
LDL-C (low density lipoprotein).....	36
Triglicérideos.....	37
d) Metabolismo dos glúcidos.....	37
Glucose.....	37
e) Metabolismo do ferro.....	38
Ferro.....	39
Transferrina.....	39
TIBC (total iron binding capacity).....	39
Saturação de transferrina.....	40
f) Metabolismo Proteico.....	40
Albumina.....	40
RPCR (Intervalo alargado de proteína C reativa).....	40

Proteínas totais no soro.....	40
Proteínas urinárias.....	41
g) Metabolismo mineral e ósseo.....	41
Cálcio.....	41
Magnésio.....	42
Fosfato.....	42
h) Função Renal.....	42
Creatinina.....	42
Ureia.....	43
Ácido úrico.....	43
Microalbuminúria.....	44
i) Função Hepática.....	44
Aminotransferases.....	44
AST (Aspartato-aminotransferase).....	45
ALT (Alanina-aminotransferase)	45
ALP (Fosfatase Alcalina).....	45
γ-Gt (Gama glutamil-transferase).....	46
Bilirrubina.....	46
j) Função Pancreática.....	47
Amilase.....	47
k) Doenças Autoimunes: Fator Reumatoide.....	47
l) Doenças Infeciosas: anticorpo anti-streptolisina O.....	48
m) Função Cardíaca.....	48
Creatina Cinase.....	48
Lactato Desidrogenase.....	49
n) Eletroforese Proteica.....	50
Caso Clínico.....	50
Hematologia.....	53
Conclusão.....	55
Referências.....	57
Anexo.....	59

Resumo

As Análises Clínicas são um meio complementar de diagnóstico muito importante. Desempenham um papel central na prestação de cuidados de saúde uma vez que permitem diagnosticar patologias, contribuindo também para a sua prevenção e deteção precoce.

Com a finalidade de preparar profissionais na área das Análises Clínicas, o Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra oferece a oportunidade de realizar um estágio curricular num laboratório de análises, desta forma consolidando os conhecimentos previamente adquiridos. Serve assim o presente relatório para descrever a experiência do estágio realizado no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CML-GS), que integra as instalações do Hospital CUF Viseu, realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu de dezembro de 2022 a abril de 2023.

Este relatório faz a caracterização do laboratório de estágio, dos setores de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia, assim como o controlo de qualidade implementado no laboratório. Embora o estágio tenha abrangido todas as valências das Análises Clínicas, este relatório dá ênfase às áreas de Bioquímica e Microbiologia. Contudo, as restantes também serão abordadas, embora com menor destaque.

Considero que a realização deste estágio foi enriquecedora não só a nível profissional como pessoal, e saio do mesmo com mais experiência laboratorial, mais confiança e conhecimento para os desafios que se avizinham.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Qualidade; Bioquímica; Microbiologia; Diagnóstico Laboratorial.

Abstract

Clinical Analysis are a very important complementary means of diagnosis. They play a central role in the provision of health care, as they allow the diagnosis of pathologies, also contributing to their prevention and early detection.

In order to prepare professionals in the area of Clinical Analysis, the Master's Degree at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra offers the opportunity to carry out a curricular internship in an analysis laboratory, thus consolidating the previously acquired knowledge. Thus, this report serves to describe the experience of the internship carried out at the Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CML-GS), which is part of the facilities of Hospital CUF Viseu, carried out within the scope of the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra . The internship ran from December 2022 to April 2023.

This report characterizes the internship laboratory, the sectors of Biochemistry, Immunology, Hematology and Microbiology, as well as the quality control implemented in the laboratory. Although the internship covered all the valences of Clinical Analysis, this report emphasizes the areas of Biochemistry and Microbiology. Nevertheless, the remaining will also be addressed, although with less emphasis.

I consider that this internship was enriching not only professionally but also personally, and I leave it with more laboratory experience, more confidence and knowledge for the challenges that lie ahead.

Keywords: Clinical Analysis; Quality; Biochemistry; Microbiology; Laboratory Diagnostic.

I. Introdução

As análises clínicas são um meio complementar de diagnóstico muito importante. Desempenham um papel central na prestação de cuidados de saúde uma vez que permitem não só diagnosticar patologias, como também para a sua prevenção e deteção precoce.

Dependendo da informação pretendida podem-se fazer várias pesquisas através da recolha dos materiais biológicos adequados. Estes podem ser: urina, sangue, fezes, saliva, líquido cefalorraquidiano, sinovial, entre outros.

No que toca à saúde, esta é uma área repleta de desafios que exige uma contínua evolução e constante atualização. Com a finalidade de preparar profissionais na área das Análises Clínicas, o Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra oferece a oportunidade de realizar um estágio curricular num laboratório de análises, desta forma consolidando os conhecimentos previamente adquiridos.

O meu estágio, que decorreu de dezembro de 2022 a abril de 2023, foi realizado no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa do Hospital CUF Viseu e orientado pelo Dr. António Fernandes.

Apesar de ter integrado as quatro grandes áreas das Análises Clínicas – Bioquímica, Microbiologia, Hematologia e Imunologia – no presente relatório serão abordadas com maior detalhe apenas as áreas de Microbiologia e Bioquímica.

II. Caracterização do Laboratório de Estágio

O laboratório Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa de Viseu, foi o local escolhido para a realização do estágio. O laboratório integra as instalações do Hospital CUF Viseu e tem como diretor técnico o Dr. António Fernandes, Farmacêutico especialista em Análises Clínicas e Genética Humana.

O laboratório dá resposta a nível hospitalar, ao serviço de urgência e ao posto de colheitas ambulatório do Hospital, e a nível comunitário, através dos diversos postos de colheita distribuídos por diferentes locais, dentro e fora de Viseu.

O laboratório consiste de uma sala ampla onde se encontram os setores de Bioquímica e Imunologia e mais duas pequenas salas, a de Microbiologia e Hematologia. Além destas, uma sala de lavagens e colorações, receção, sala de triagem, um gabinete de validação biopatológica e uma sala polivalente onde se realizam ensaios serológicos e testes de biologia molecular.

As amostras do Serviço de Urgência do Hospital chegam ao laboratório através de assistentes operacionais e vêm desde logo devidamente etiquetadas. As amostras devem ser triadas e processadas o mais rapidamente possível pois o clínico está a aguardar os resultados, para com base neles poder dar seguimento à terapêutica do paciente. Quanto aos produtos provenientes de postos de colheita externos, estes chegam através de estafetas, que os transportam no interior de malas térmicas devidamente acondicionadas. Apesar de virem igualmente etiquetados, os produtos externos são primeiramente direcionados à sala de triagem. Aqui vai-se perceber quais as análises a realizar, se as colheitas foram efetuadas em conformidade com as análises pedidas e se há análises que tenham que ser realizadas no exterior. É na triagem que se aceitam ou rejeitam as amostras consoante as colheitas foram feitas em recipientes adequados, se estão devidamente identificadas e etiquetadas, se o volume é suficiente ou há presença de hemólise, entre outras não conformidades.

Posto isto, os produtos que estão em conformidade são centrifugados, se assim for necessário, e distribuídos pelos diferentes setores de acordo com as análises solicitadas. No entanto, há parâmetros que não são realizados no CML-GS Viseu. Nestes casos, faz-se a separação de alíquotas, as quais são armazenadas e enviadas a laboratórios externos com os quais o laboratório possui protocolos, nomeadamente o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (Laboratório Central) em Lisboa e o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa no Porto.

Após distribuição das amostras pelos diversos setores, estas são processadas. Os resultados analíticos passam por uma primeira validação a nível dos equipamentos, feita pelas técnicas do laboratório. Esta validação consiste de uma comparação dos resultados com os valores de referência e da realização de repetições de parâmetros, quando necessário, conforme padrões previamente estabelecidos. Posteriormente os resultados passam por uma validação final, pelo Diretor Técnico do laboratório, o Dr. António Fernandes.

O sistema informático utilizado no laboratório CML-GS Viseu designa-se de *Apollo*. Este sistema integra todos os postos de colheita do laboratório, permite a validação dos resultados comunicados pelos equipamentos, consultar o histórico clínico dos utentes e rastrear as amostras.

III. Controlo de Qualidade

O laboratório deve garantir a máxima fiabilidade e rigor dos resultados, assegurando a qualidade dos serviços prestados, pelo que se torna essencial a adoção de um sistema de

gestão de qualidade (SGQ). Com vista a orientar a implementação e manutenção de um SGQ, o grupo Germano de Sousa encontra-se certificado segundo a Norma ISO 9001:2015. Neste sentido, o laboratório CML-GS Viseu aplica controlos de qualidade internos (CQI) e está também inserido em programas de avaliação externa de qualidade (AEQ).

a) Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O CQI avalia a precisão analítica e consiste num conjunto de preparações comerciais em que a concentração de cada analito é conhecida, existindo 3 níveis, os quais incluem os níveis normais e os patológicos. Os controlos são realizados diariamente ou semanalmente, consoante o parâmetro e o equipamento. Para cada equipamento está definido um mapa com os níveis que devem ser controlados e os respetivos dias da semana.

Após a passagem dos controlos, são desenhadas automaticamente nos equipamentos as cartas de Levey-Jennings. Os critérios de análise baseiam-se nas regras de Westgard e são previamente estabelecidos pelo diretor técnico. Diariamente, as cartas são monitorizadas pelas técnicas responsáveis de cada setor, e mensalmente, avaliadas pelo responsável de qualidade e direção do laboratório.

Do CQI fazem ainda parte as calibrações periódicas, ou sempre que há novos lotes de reagentes, e as manutenções semanais e mensais aos equipamentos.

b) Avaliação Externa de Qualidade (AEQ)

No sentido de avaliar a exatidão analítica, o laboratório CML-GS Viseu está inserido em vários programas de AEQ como o da *Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC)*, *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)* e o Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial do Instituto Ricardo Jorge.

Esta AEQ baseia-se numa avaliação comparativa entre o desempenho do nosso laboratório com outros que participem no programa. Para esse fim, são enviadas por parte do laboratório responsável pela avaliação, amostras cegas que deverão ser processadas como amostras normais. Os resultados obtidos são depois comparados com o valor real da amostra e com os resultados obtidos pelas outras entidades participantes, que usem as mesmas metodologias. Assim, é possível avaliar o desempenho de um método ou equipamento, alertando para a necessidade de ações corretivas, de forma a não comprometer a qualidade de análises futuras.

IV. Microbiologia

O laboratório de Microbiologia Clínica tem um papel importante no diagnóstico e controlo de doenças infecciosas. No entanto, a capacidade do laboratório realizar essas funções é limitada pela qualidade da amostra, pelo seu transporte até ao laboratório e pelas técnicas utilizadas para deteção do microorganismo¹.

Ao longo do dia chegam ao laboratório vários tipos de produtos biológicos, sendo que o seu processamento varia consoante o tipo de amostra. O objetivo é averiguar a existência de um agente patogénico que esteja a provocar infeção, e nesse caso, fazer a sua identificação e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

As amostras de urinas e fezes são as mais frequentes! No entanto, os exsudados vaginais, uretrais, amostras do trato respiratório superior e inferior, líquidos diversos (sinovial, ascítico, LCR, etc.) e outros tipos de amostras também são processados no laboratório.

Este setor é o menos automatizado, exigindo assim um maior trabalho manual. Porque é o que envolve mais trabalho técnico, é o que exige também um maior controlo das condições de trabalho através de boas práticas laboratoriais.

Ao longo da minha experiência na Microbiologia, tive a oportunidade de integrar a rotina desde a triagem das amostras até ao seu processamento. Pude realizar colorações de Gram, de Wright, técnicas de sementeira, execução de identificações e antibiogramas, assim como acompanhar a interpretação dos resultados obtidos consoante a situação clínica.

a) Identificação e suscetibilidade antimicrobiana

Aquando da chegada das amostras ao laboratório é importante fazer a sua avaliação, perceber se estão em condições de serem analisadas. Se a requisição está conforme, se há quantidade e qualidade suficiente para a análise, se a colheita e transporte foram em recipientes adequados... Estes são alguns dos parâmetros essenciais para o sucesso analítico.

A observação macroscópica é outro aspeto importante a registar, ou seja, a cor da urina, consistência de fezes, aspeto da expectoração ou presença de sangue na amostra, por exemplo.

De seguida é realizado o exame direto, importante na avaliação da qualidade das amostras, mas também na interpretação de resultados culturais com base nas características morfológicas microscópicas, no diagnóstico de infeções e na necessidade de processos não rotineiros. O exame direto é constituído pelas preparações a fresco e preparações coradas (coloração de Gram, de Wright e de Ziehl-Neelsen p.ex.).

As preparações a fresco são utilizadas sobretudo na observação de sedimentos urinários, fezes e na pesquisa de *Trichomonas vaginalis* em exsudados vaginais. Uma vez que a maioria das bactérias são transparentes e difíceis de observar por exame direto, devido ao seu protoplasma pouco refringente, as amostras são normalmente coradas. A coloração mais comum é a coloração de Gram, que permite dividir as bactérias em 2 grupos, as Gram positivas e as Gram negativas. Os resultados fornecidos por esta técnica proporcionam informação valiosa sobre as bactérias que causam determinadas doenças, assim como ajudam a selecionar os testes necessários para a sua identificação².

A distinção entre os dois grupos de bactérias está associada com a natureza química da parede bacteriana. Bactérias com paredes constituídas por espessas camadas de peptidoglicano e ácidos teicoicos, retêm o primeiro corante adicionado (violeta de Genciana) e são designadas por Gram positivas. Por outro lado, as Gram negativas, possuem paredes com finas camadas de peptidoglicano e ainda uma membrana externa, constituída por fosfolípidos e lipopolissacarídeos (LPS), que não retêm este corante. Assim, quando em seguida se adiciona o corante secundário, Fucsina de Ziehl diluída ou a Safranina, este é retido pelas bactérias, que previamente haviam sido descoradas.

A coloração, além desta caracterização, permite também fazer uma definição quanto à morfologia – cocos ou bacilos – e o tipo de agrupamento – em cadeia, cacho, pares, entre outros.

Quanto às micobactérias, estas possuem paredes celulares bastante espessas e complexas, constituídas por peptidoglicano ligado a arabinoglicano, que por sua vez está ligado a ácidos micólicos. Estes lípidos tornam a sua membrana muito hidrofóbica e pouco permeável aos corantes do Gram. A única maneira de corar o seu protoplasma é usando uma solução de fucsina em fenol, cuja descoloração com solução de etanol e ácido clorídrico não ocorre, dizendo-se por isso que são bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR)².

A realização do exame microscópico é importante por várias razões, nomeadamente para determinar o número de neutrófilos segmentados, indicar o tipo e magnitude de resposta inflamatória, a observação de bactérias, estruturas parasitárias ou inclusões virais. Esta observação pode fornecer desde logo informação suficiente para diagnóstico presuntivo, permitindo ao clínico a tomada de decisões mais racionais numa abordagem antimicrobiana inicial³. No entanto, é fulcral a realização de um exame cultural para diagnóstico final, verificando se ocorre crescimento de microorganismos e fazer a sua caracterização fisiológica e bioquímica.

No laboratório, os produtos biológicos são inoculados diretamente ou após tratamento, em meios de cultura apropriados, de acordo com o microorganismo de que se suspeita. Os meios de cultura podem ser líquidos, sólidos ou semi-sólidos e dividem-se ainda em seletivos, de enriquecimento e diferenciais. Os seletivos são utilizados para o isolamento de organismos específicos, sendo suplementados com substâncias inibidoras de crescimento de organismos indesejados. Os enriquecidos são desenhados para permitir o crescimento de organismos mais fastidiosos, que têm necessidades nutricionais específicas e por isso requerem a adição de fatores de crescimento. Os diferenciais, permitem detetar características bioquímicas importantes para uma identificação preliminar³.

No laboratório de estágio, os meios utilizados são apresentados na Tabela I.

O sucesso dos métodos de cultura é definido pela biologia do organismo, pelo local da infeção, pela resposta imune do paciente à infeção e pela qualidade do meio de cultura³.

Após inoculação, são selecionadas as condições de temperatura, atmosfera, humidade e período de incubação, de acordo com as necessidades específicas de cada bactéria. Ao fim do período definido, se houver crescimento de colónias isoladas e após interpretação desse crescimento, avalia-se a necessidade de uma subsequente identificação e antibiograma do microorganismo.

Tabela I. Meios de Cultura utilizados no CML-GS Viseu.

BHI: caldo cérebro-coração	Meio não seletivo, rico e nutritivo, que permite o crescimento de microorganismos exigentes.
HAE2: gelose de Chocolate <i>Haemophilus sp</i>	Isolamento seletivo de <i>Haemophilus spp</i> ; em amostras respiratórias e genitais. Não permite crescimento de gram positivos nem leveduras. Enriquecido com fator X e V.
MSA2: gelose Chapman 2	Meio seletivo para isolamento de <i>Staphylococcus spp</i> . A concentração elevada de NaCl inibe o crescimento de bactérias que não sejam <i>Staphylococcus spp</i> ; A presença de manitol permite identificação presuntiva de <i>S. aureus</i> (colónias amarelas).
MCK: Gelose MacConkey	Meio seletivo e diferencial para bacilos Gram negativos. A presença de sais biliars inibe o crescimento de bactérias Gram positivas, e a lactose permite distinguir as fermentadoras das não fermentadoras.
LJ: Meio Lowenstein-Jensen	Isolamento de Micobactérias. O verde malaquite inibe o crescimento da maioria dos restantes microorganismos.
VCA3: Gelose chocolate + PolyViteX VCAT3	Isolamento seletivo de <i>Neisseria meningitidis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . Constituído pelos fatores X e V e um conjunto de antibióticos (vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim).
Caldo Selenito	Meio líquido de enriquecimento de <i>Salmonella spp</i> , a partir de amostras de fezes.

PVX: Gelose Chocolate PolyViteX	Meio de isolamento de bactérias exigentes dos géneros <i>Neisseria spp</i> , <i>Haemophilus spp</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Enriquecido com fator X e V.
SGC2: Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol	Meio de isolamento seletivo de leveduras e bolores.
COS: Gelose Columbia + 5% sangue de carneiro	Meio de isolamento que facilita o crescimento de bactérias exigentes. Permite a observação ou não de hemólise e o tipo de hemólise.
CPSE: Gelose chromID® CPS® Elite	Meio de isolamento, contagem e identificação bacteriana em amostras de urina. Permite ID direta de <i>E.coli</i> e presuntiva das seguintes espécies: <i>Enterococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> e <i>Providencia</i> .
HEKT: gelose Hektoen	Meio seletivo diferencial de <i>Salmonella spp</i> e <i>Shigella spp</i> . A constituição em sais biliares inibe o crescimento de Gram positivos e retarda o crescimento de algumas Enterobactérias.
STRB: Gelose chromID™ Strepto B	Meio cromogéneo seletivo, para deteção de <i>Streptococcus agalactiae</i> em mulheres grávidas.
CNA: Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro suplementado com colistina e ácido nalidíxico (CNA)	Meio seletivo de bactérias Gram positivo, devido à constituição em colistina e ácido nalidíxico que inibe crescimento de Enterobactérias e <i>Pseudomonas spp</i> . Permite a observação de hemólise.
TODD HT: Caldo Todd Hedwitt	Meio líquido de enriquecimento seletivo de <i>Streptococcus</i> do grupo B, na mulher grávida, e de <i>Staphylococcus aureus</i> , no âmbito do rastreio de MRSA.

Testes subsequentes são utilizados com o objetivo de identificar um isolado através de atividade bioquímica ou metabólica. Estes testes (Tabela II) também são importantes para a escolha das cartas de identificação e de suscetibilidade antimicrobiana a utilizar no equipamento **Vitek 2 Compact** existente no laboratório CML-GS.

Tabela II. Provas Bioquímicas auxiliares à identificação bacteriana.

Prova da catalase	Efervescência indica a produção de oxigénio molecular e resultado positivo. Falsos positivos podem ocorrer em colónias a partir de geloses de sangue devido à peroxidase eritrocitária. Este teste é sobretudo utilizado para diferenciar <i>staphylococcus</i> (positivos) de <i>streptococcus</i> (negativos).
Prova da oxidase	O aparecimento de cor azul-roxo escuro indica atividade de citocromo oxidase e resultado positivo. O teste utiliza um corante que substitui o O ₂ como aceitador de hidrogénio. Utiliza-se papel de filtro onde se colocam algumas gotas de reagente, e com uma ansa, retira-se a colónia a testar e coloca-se sobre o papel.
Teste do Indol e TDA	Baseia-se na formação de uma cor vermelha, derivada da desaminação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase.
Disco de optoquina	A optoquina inibe o crescimento de <i>S. Penumoniae</i> , provocando um halo de inibição na placa.
Disco de Bacitracina	<i>Streptococcus</i> beta hemolítico do grupo A é inibido em gelose de sangue quando na presença de bacitracina.

Estas cartas consistem em diferentes poços onde ocorrem provas bioquímicas ou que possuem concentrações conhecidas de antibióticos específicos.

Partindo de colónias isoladas da gelose, faz-se uma suspensão em solução salina, com densidades entre 0,55-0,66 MacFarland. Desta suspensão, faz-se diluição para um outro tubo para a realização do teste de suscetibilidade. O princípio consiste na técnica de dupla diluição para as Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) determinadas pelo método de microdiluição. As cartas são em seguida colocadas nos respetivos tubos, dispostos numa cassete, a qual é depois introduzida no **Vitek 2 Compact**. Numa primeira fase de enchimento, todas as cartas são inoculadas com a suspensão dos tubos de ensaio correspondentes, e na fase seguinte, o equipamento vai proceder às análises de identificação e suscetibilidade, fazendo monitorização contínua do crescimento e atividade dos microorganismos no interior das cartas. Essa leitura é feita mediante um sistema ótico de transmitância, utilizando luz visível para medir de forma proporcionalmente direta o crescimento.

Após o tempo de incubação necessário para essas reações, os resultados são enviados para um computador e procede-se à validação dos mesmos, nomeadamente à seleção dos antibióticos mais adequados à situação clínica do utente.

b) Produtos biológicos

Urina

A urina representa o maior volume de amostras que chegam da rotina. Estas amostras podem ser colhidas pelo próprio utente, ao qual é explicada a forma correta de o fazer, no sentido de evitar a contaminação com flora vaginal, perianal e uretral. Também podem ser colhidas amostras por punção suprapúbica, cateterização ou em sacos coletores de urina, no caso de crianças de fralda.

As amostras devem ser colhidas para frascos plásticos estéreis, entregues e processadas o mais rapidamente possível, uma vez que o crescimento bacteriano continua a ocorrer e o qual poderá inviabilizar os resultados. No caso de tal não poder ser feito nas 2 horas seguintes, a urina deve ser refrigerada a 4°C.

As **análises sumárias de urina** ou **urina tipo II**, são os exames mais requeridos e são de carácter qualitativo. A primeira urina da manhã é a melhor amostra pois é aquela que se encontra mais concentrada. São medidos vários parâmetros bioquímicos como a cor, densidade, o pH, glucose, proteínas, nitritos, leucocitúria e hematuria, através de tiras reagente, no equipamento **Aution Max AX-4280**. De seguida, procede-se à centrifugação a 1500rpm/5min, decantação e exame microscópico do sedimento urinário. O exame consiste numa observação e contagem de pelo menos 10 campos, inicialmente com a objetiva 10x e

posteriormente passando para a de 40x, registando-se a presença de hemácias, leucócitos, bactérias, fungos, células epiteliais, cilindros e cristais⁴.

A **Urocultura** é um exame que permite fazer avaliação etiológica de utentes com infeção do trato urinário (ITU). A maioria destas infeções são causadas por Enterobactérias, estando em primeiro lugar a *Escherichia coli*, mas também *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*; outras gram-negativas como *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* e algumas gram-positivas como *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.*

Após homogeneização, as amostras são inoculadas diretamente na **Gelose chromID™ CPS® Elite** (CPSE) usando ansas de 1µl, pois a placa é dividida em duas partes. Segue-se o período de 18-24h de incubação em aerobiose, a 35±2°C. Após esse período, procede-se à observação das geloses, para verificar se houve crescimento e no caso de tal se ter verificado, proceder à valorização dos resultados.

A gelose **CPSE** permite identificar diretamente a *Escherichia coli*, através da coloração vermelha/rosa das colónias. O género *Enterococcus spp.*, apresenta-se como pequenas colónias turquesa ou azul claro a verde e ainda colónias de tom castanho difuso para o género *Proteus spp.* Mais do que a cor, o aspeto das colónias também fornece informações relevantes, como por exemplo a mucosidade caraterística de bacilos. (Figura 1)

Há sempre 3 parâmetros essenciais que têm que ser considerados: a clínica (presença ou ausência de sintomas caraterísticos de ITU), a presença de leucócitos no exame citológico, e a bacteriúria. Bacteriúria significativa é a que apresenta valores de 10⁵ UFC/ml, exceto para *E.coli*, em que 10³ UFC/ml já é significativo. Esta contagem é feita multiplicando o número de colónias observadas no meio CPSE por um fator de diluição de 1000 (uma vez que se utilizam ansas de 1µl). Contagem inferior de colónias é dada como urocultura negativa.



Figura 1. Crescimento em meio CPSE de *Klebsiella pneumoniae*, onde é possível visualizar a característica coloração verde/azul e a mucosidade. (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu)

Uroculturas positivas e a valorizar: quando $\geq 10^5$ UFC/mL, cultura pura, leucocitúria e presença de quadro clínico; quando $\geq 10^3$ UFC/mL, leucocitúria e sintomas, para as bactérias *E. Coli* e *Staphylococcus saprophyticus*; quando há $\geq 10^5$ UFC/mL e presença de 2 espécies, sendo que uma delas predomina e apresenta colónias isoladas, num doente com leucocitúria e quadro clínico. Por outro lado, crescimento polimicrobiano, mesmo na presença de leucócitos, é muitas vezes

sugestivo de contaminação associada a uma má colheita da amostra, e nestes casos, o resultado é dado como cultura polimicrobiana, a valorizar pela clínica. Existem outras situações, em que a avaliação deve ser feita de acordo com o tipo de doente em causa.

A partir das uroculturas positivas, vai-se proceder a identificação e testes de suscetibilidade aos antibióticos, a realizar no **Vitek 2 Compact**.

Neste setor, há ainda um grande número de urinas que têm que ser direcionadas para o setor de Bioquímica, para determinação de parâmetros como a microalbuminúria e proteinúria.

Fezes

Ao laboratório chegam pedidos de pesquisa de sangue oculto, testes parasitológicos e coproculturas. Em qualquer um destes testes, uma observação da amostra poderá dar desde logo algumas indicações, como a presença visível de sangue, de parasitas, a própria consistência da amostra, sugestiva de certas infeções bacterianas.

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é o teste mais solicitado para despiste de sangramento colorretal característico de cancro do cólon. Consiste num ensaio imunocromatográfico *sandwich* para deteção qualitativa de hemoglobina humana nas amostras. O teste faz-se acompanhar de um tubo de plástico com um tampão diluente, onde se coloca um pouco de amostra para dissolução e extração de hemoglobina. De seguida, deixam-se cair 3 gotas de solução no local indicado no teste e, em 10 minutos obtém-se o resultado.

Os exames parasitológicos baseiam-se no método Baileger (princípio de sedimentação), para concentração de elementos parasitários em amostras de fezes. Para a sua realização são enviadas 3 amostras, colhidas em 3 dias alternados, das quais se retira uma porção e se adiciona ao tubo com a solução Baileger. Após homogeneização, adiciona-se 1ml de acetato de etilo e é adaptado um tubo de filtro ao tubo de amostra, para que, fazendo inversão deste, ocorra a filtração. Procede-se à centrifugação a 1500rpm/10min para que a sedimentação de protozoários e ovos e larvas de helmintas possa ocorrer. A fase líquida é decantada e são adicionadas algumas gotas de Lugol ao sedimento para posterior exame microscópico. As ampliações a utilizar são a de 100x, para ovos e larvas, e a de 400x-1000x para protozoários

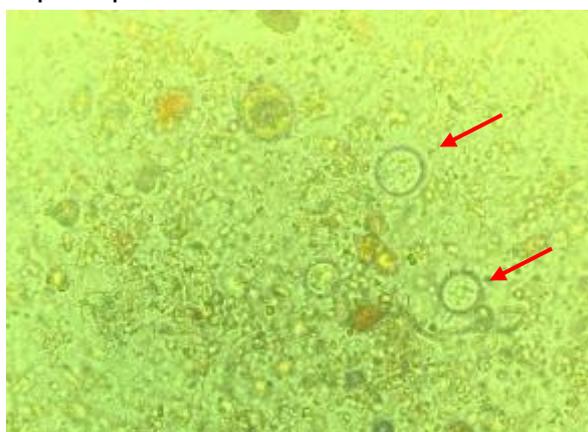


Figura 2. Observação microscópica (objetiva de 40x) de quisto de *Entamoeba Coli*, em amostra de fezes. (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu)

(Figura 2), exigindo assim uma dupla visualização da lâmina.

Nas coproculturas, é necessário fazer exames diretos e exames culturais. No laboratório de estágio faz-se a pesquisa de rotina de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Campylobacter spp.* Inicialmente, e no caso das amostras serem sólidas, é necessário preparar-se uma suspensão, com um pouco de solução salina. A partir dessa suspensão, preparam-se duas lâminas, uma para exame citológico, e outra para a coloração de Gram. Para os exames culturais, semeia-se a suspensão, com uma ansa de 10µl, nos meios **CAM**, **MACK** e o caldo **selenito** que são depois colocados na estufa, em condições apropriadas. A gelose CAM é colocada em atmosfera microaerofílica, 35±2°C, enquanto que as restantes, são colocadas em atmosfera aeróbia, 35±2°C. À exceção do caldo selenito, que ao fim das primeiras 18-24h é repicado para gelose **Hektoen**, os restantes meios permanecem em incubação por 48h.

Terminado o período de cerca de 48h, procede-se à leitura das placas. No caso de se verificar crescimento com significado patológico, prossegue-se com identificação e Antibiograma.

Exsudado vaginal

A flora vaginal varia consoante inúmeros fatores, desde a idade, o pH, consumo de fármacos e atividade sexual. Mas existem microorganismos que não pertencem à microbiota normal, são patogénicos. Destes, os que normalmente se pesquisam são: *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp.*, *Haemophilus ducrei* e *Gardnerella vaginalis*. Há ainda o caso característico de mulheres grávidas, em que se valoriza a presença de *Streptococcus agalactiae*.

As amostras são colhidas em zaragatoas secas e colocadas em meio de transporte Stuart ou Amies com carvão. Em primeiro lugar, com a própria zaragatoa preparam-se 3 lâminas, uma para exame direto (observação do movimento característico de *Trichomonas vaginalis*), outra para exame citológico (pesquisa de células, leucócitos, eritrócitos, fungos e parasitas) e outra para o Gram (polimorfonucleares e flora). De seguida prepara-se uma suspensão e semeiam-se os meios **SGC2**, **PVX**, **CNA** e **VCA3**. Ao fim de 24/48h procede-se à leitura e valorização dos resultados, sendo fundamental saber distinguir os microorganismos potencialmente patogénicos, daqueles que fazem parte da microbiota, para posteriormente se identificar e reportar aqueles de importância clínica.

Na gelose SGC2, a presença de colónias redondas brancas (Figura 3) deve ser tida em atenção. Perante esse crescimento, é realizada a prova da filamentação, fazendo-se suspensão de uma colónia em 0,5mL de soro humano, de preferência fresco, que vai incubar a 37°C por cerca de 2,5-3horas. Em seguida, faz-se exame microscópio entre lâmina e lamela de forma a

averiguar se há a formação de um tubo germinativo verdadeiro ou não (Figura 4). A observação de tubo germinativo verdadeiro, contínuo com a célula mãe, permite fazer identificação presuntiva de *Candida albicans*. De outra forma, o resultado é dado como apenas sendo elementos leveduriformes do género *Candida spp.*



Figura 3. Gelose SGC2 com crescimento de colónias sugestivas de *Candida spp.* (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu).

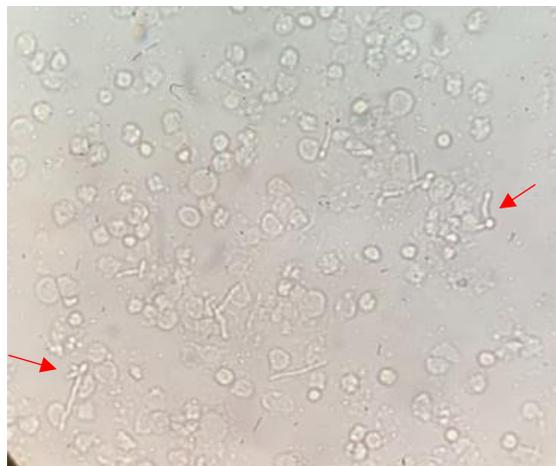


Figura 4. Observação microscópica (objetiva 40x), após a prova da filamentação, de elementos leveduriformes com formação de pseudohifas, sugestivo do género *Candida spp.* (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu)

Tal como mencionado, nas grávidas, faz-se a pesquisa de *Streptococcus* beta-hemolíticos, dado que este pode ser transmitido durante o parto levando a meningites, septicémias ou pneumonias do recém-nascido. A pesquisa inicia-se com a inoculação do meio **Todd hewitt**, por 24h , $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, período após o qual se faz repicagem para o meio **STRB**, que vai permanecer em atmosfera rica em CO_2 por mais 48h. Resultados positivos consistem na presença, nem que seja de apenas uma, colónia rosa pálido a vermelho (Figura 5).

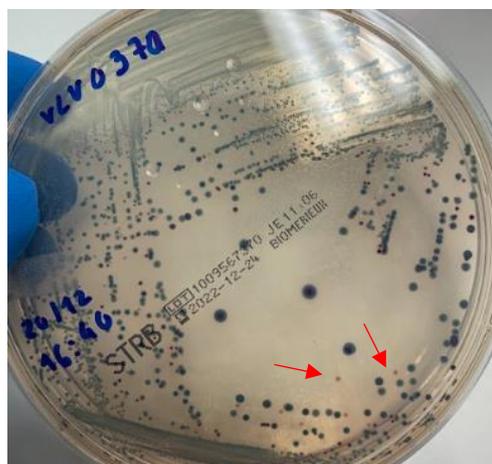


Figura 5. Gelose STRB com colónias de *Streptococcus agalactiae*. (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu)

Exsudado uretral

Também na uretra, na parte inferior, podemos encontrar uma flora de microorganismos como, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Enterococcus spp.*, bacilos gram negativos e *Neisseria spp.*. No entanto, a presença de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*, por exemplo, é sinónimo de infeção.

A colheita deve ser feita antes da primeira micção da manhã, mas se tal não for possível, deverá ser feita após pelo menos uma hora desde a última micção. A colheita consiste de 2 zaragoas,

uma para preparação de lâminas para o exame direto e outra para o exame cultural, sendo que esta última é transportada em meio de carvão⁵.

No exame direto preparam-se 3 lâminas, uma a fresco – observação da presença de *Trichomonas vaginalis* e elementos leveduriformes – e duas após coloração, de Gram – visualização de algum tipo morfológico predominante- e de Wright – observação de leucócitos, células.

A interpretação do Gram é muito importante, devendo ter-se em especial atenção a presença de diplococos Gram negativos intra e extracelulares e numerosos leucócitos polimorfonucleares. Em homens sintomáticos, a observação de um gram com estas características traduz uma infecção gonorreica. Por outro lado, em mulheres, a realização de exame cultural é obrigatória, uma vez que o exame direto não é específico, dado a existência na flora vaginal de microorganismos semelhantes a *Neisseria gonorrhoeae*.

Para o exame cultural semeiam-se 2 meios, o **PVX** e o **VCA3**, que vão incubar em meios ricos em CO₂ a 37°C por 48h. Na gelose VCA3, o crescimento de pequenas colônias, brilhantes, aczentadas e sem hemólise, são sugestivas de *Neisseria gonorrhoeae*. As provas de oxidase e catalase devem ser realizadas, e para esta bactéria, os resultados deverão ser positivos.

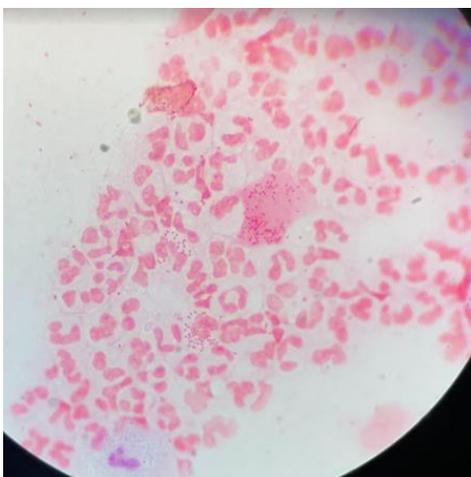


Figura 6. Observação microscópica (100x) de um esfregaço de exsudado uretral após coloração de Gram. Presença de Diplococos Gram negativos intra e extracelulares e leucócitos polimorfonucleares. (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu)



Figura 7. Gelose VCA3 com crescimento de colônias sugestivas de *Neisseria gonorrhoeae*. (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu)

Sangue: Hemocultura

O sangue, normalmente, é estéril. No entanto, quer seja de forma transitória, intermitente ou contínua, podemos ter presentes microorganismos, dando origem a situações de bacteriemia, virémia ou fungemia.

As hemoculturas são exames culturais que permitem determinar a presença de microorganismos na corrente sanguínea. O sucesso deste exame está dependente da forma como se faz a colheita. Para começar, as colheitas devem ser realizadas, sempre que possível, antes de se iniciar antibioterapia e ter o máximo rigor no processo, evitando contaminação com a microbiota da pele. Utilizando uma seringa de 20mL, faz-se venopunção, colocando em primeiro lugar o frasco aeróbio, na posição vertical, no qual é introduzido um adaptador Vacutainer para inoculação da amostra. Após alcançar o nível desejado, retiramos o adaptador e introduzimo-lo no frasco anaeróbio. No final, deve-se agitar os frascos e levar de imediato ao laboratório.

O volume colhido é a variável mais importante no rendimento da hemocultura, de forma a garantir a recuperação máxima de microorganismos. Nos adultos, um total de 20-30mL é o adequado e em pediatria, volumes de 1-5mL são suficientes.

Chegados ao laboratório, os frascos de cultura BACTEC são rapidamente introduzidos no equipamento **BD Bactec FX40** de forma a garantir a eficácia do desempenho. Na presença de microorganismos, ocorre metabolização dos nutrientes do meio, havendo libertação de CO₂ que altera a quantidade de luz absorvida pelo material fluorescente do sensor. O instrumento tem fotodetetores que medem o nível de fluorescência correspondente à quantidade de CO₂ libertada. Perante resultados positivos, o equipamento emite um sinal sonoro e luminoso (vermelho).

Isolados clinicamente significativos são detetados nos primeiros 1 a 2 dias de incubação; no entanto, só ao final de 5-7 dias se pode dar um resultado como negativo. De realçar que, no entanto, aquando da pesquisa de fungos, micobactérias, *Brucella* spp. ou outros, tal deverá ser reportado ao laboratório, uma vez que são necessários períodos de incubação mais longos para que ocorra crescimento.

Frascos positivos são retirados e após homogeneização e desinfeção da tampa, é inserida uma agulha deixando cair algumas gotas em 2 lâminas e nos meios de cultura **COS** e **CPSE**. As lâminas são preparadas, coradas pelo Gram e observadas de imediato, uma vez que a morfologia observada pode desde logo orientar a decisão terapêutica. Os meios são incubados por 48h, o COS em CO₂ e o CPSE em aerobiose. No laboratório de estágio, o recurso ao

meio CPSE tem como finalidade obter uma identificação presuntiva mais rápida e fácil. Os resultados da sementeira e do Gram são analisados, e prossegue-se com identificação e antibiograma para os isolados mais sugestivos.

Isolados de *Corynebacterium sp*, *Bacillus sp* (exceto o *B. Anthracis*), *Micrococcus sp* e *Staphylococcus coagulase negativo* são normalmente contaminantes que têm origem na flora da pele e que confundem a interpretação de resultados positivos. A decisão de valorizar ou não a presença desses isolados é cada vez mais difícil uma vez que cada vez mais estão envolvidos com situações bacteriêmicas, em especial os isolados de *Staphylococcus coagulase negativos*. Assim, a decisão deve ser considerada pela clínica³.

Isolados de bacilos gram negativos, leveduras, *Streptococcus beta hemolíticos*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, e *Staphylococcus aureus* são clinicamente significativos³.

Infeções trato respiratório superior

O trato respiratório superior é colonizado por numerosos microorganismos que na sua maioria não são virulentos e raramente se associam a doença. No entanto, quando alcançam locais habitualmente estéreis, passam a ser patogénicos. O trato respiratório possui barreiras naturais à infeção, desde os pêlos nasais, humidificação das fossas nasais, secreção de fatores antimicrobianos e a própria microbiota. As bactérias aeróbias mais comuns são o *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.* e *Neisseria spp.*, mas organismos potencialmente patogénicos tais como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e membros das *Enterobacteriaceae*, também podem aqui estar presentes. O seu isolamento em amostras respiratórias superiores não determina infeção, há que distinguir com colonização¹.

As infeções respiratórias superiores mais comuns são as rinfaringites, gripes, faringites e sinusites. Embora as principais causas de faringites sejam virais, as bacterianas, por *Streptococcus* do grupo A, e em especial o *S. Pyogenes* também ocorrem.

No laboratório de estágio, a pesquisa de *Streptococcus* do grupo A é realizada sobretudo em contexto de urgência, através de um teste rápido imunocromatográfico que deteta qualitativamente a presença do Antígeno estreptocócico do grupo A, em amostras colhidas por zaragatoa faríngea. Em apenas 10mins o resultado é dado como positivo ou negativo. Pode também realizar-se um exame cultural de exsudado faríngeo para pesquisa do *Streptococcus pyogenes*, baseado na inoculação do meio CNA com um disco de bacitracina. Quando se

retiram as placas da estufa, se um halo inibitório for observado, suspeita-se de *Streptococcus* do grupo A, devendo prosseguir-se com identificação e antibiograma.

A detecção de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes, MRSA, é uma prova que consiste de um exame cultural em gelose **MSA2**. A gelose é inoculada segundo a técnica de sementeira em toalha, garantindo que toda a superfície é semeada pelo menos duas vezes, e no centro da placa, é depois adicionado um disco de cefoxitina.

Os MRSA são resistentes a todos os beta-lactâmicos devido à presença de *mecA*, um gene que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a)⁶. Esta proteína liga-se aos beta-lactâmicos com menor avidéz, resultando na resistência a esta classe de antibióticos, tornando-se assim importante identificar hospedeiros e eliminar a bactéria. Este exame é pedido sobretudo em contexto pré-operatório, dado que pessoas colonizadas por este microorganismo, têm maior probabilidade de desenvolver infeções com graves consequências após procedimentos cirúrgicos, mesmo estando sob terapias antibióticas profiláticas.

A mudança de cor do meio para amarelo, devido à fermentação do manitol, é sugestiva de *S. Aureus* e a resistência é avaliada através do halo de inibição que se forma na placa.

Infeções trato respiratório inferior

Laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e pulmões são normalmente estéreis, embora a colonização transitória com secreções do trato superior se possa verificar. As infeções mais comuns são as bronquiolites, pneumonias, legioneloses e empiemas, que resultam da inalação de aerossóis infecciosos, da aspiração do conteúdo oral ou gástrico ou de disseminação hematogénea, sendo que, tal acontece porque as barreiras do trato superior são ultrapassadas.

As expetorações são as amostras mais comuns para exame bacteriológico deste tipo de infeção. A colheita deve ser feita pela manhã, pois durante a noite ocorre uma acumulação de secreções, havendo assim maior probabilidade de bactérias patogéneas estarem aí concentradas³. Devido à dificuldade na colheita, a qualidade da amostra é o primeiro parâmetro que se deve avaliar, garantindo que esta tem condições que permitam fazer diagnóstico correto.

Por observação de um esfregaço com Gram, na objetiva 10x, se estivermos na presença de pelo menos 25 leucócitos e máximo de 10 células epiteliais, em cerca de 10 campos, a amostra é aceite. Mais ainda, a coloração de Gram é fundamental para observar se há contaminação com microbiota do trato superior e/ou presença ou ausência de microorganismos sugestivos e células inflamatórias.

Para a cultura, a amostra é semeada no meio **COS, MCK, HAE2** e **CNA**. O meio COS, HAE2 e CNA são incubados por 48h, a 37°C em meio rico em CO₂. No meio CNA é colocado um disco de optoquina para averiguar quanto à presença do agente *Streptococcus pneumoniae*. Contrariamente aos outros estreptococos, especialmente os alfa hemolíticos, *S. Pneumoniae* é geralmente sensível à optoquina.

Se ocorrer crescimento bacteriano nos meios, e juntamente com as informações recolhidas do exame direto e informações clínicas do utente, faz-se a valorização das colónias para posterior identificação e antibiograma.

No laboratório de estágio, normalmente, a acompanhar o bacteriológico, é realizado também o BK (bacilo de Koch) direto. Este é um exame que desempenha importante papel no diagnóstico presuntivo de tuberculose. Baseia-se nas características da parede celular das micobactérias, quanto à resistência à descoloração com álcool-ácido. O método utilizado é a coloração de Ziehl-Neelsen, que confere a tonalidade avermelhada aos Bacilos ácido-álcool resistentes.

O exame micobacteriológico cultural, continua a ser o gold-standard no diagnóstico de tuberculose. Quando este exame é requerido ao laboratório e após o processo inicial de avaliação de qualidade da amostra, faz-se uma descontaminação da expectoração para que sejam eliminadas quaisquer bactérias contaminantes ou da flora do trato respiratório superior. A solução de descontaminação é adicionada à amostra e deixada atuar por 15mins, período ao final do qual vai a centrifugar. Após decantação, o sedimento, é semeado no meio de cultura sólido de **Lowenstein-jensen**. O crescimento é demorado, sendo necessárias 2-3 semanas para obtermos resultados positivos. Com este meio, é possível fazer uma leitura quantitativa, através da contagem das colónias, tornando-o um método mais adequado para monitorização terapêutica⁷. As colónias de *M. Tuberculosis* apresentarão um aspeto característico semelhante a couve-flor.

Infeções auriculares

De entre as infeções do trato respiratório superior podemos ainda considerar as infeções do ouvido externo e as otites médias. Nas primeiras, os agentes de infeção mais frequentes são o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes*. Nas otites médias, os microorganismos mais frequentemente encontrados são o *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e o *S. pyogenes*. No entanto, também há casos de infeção por *Pseudomonas sp*, membros de *Enterobacteriaceae* e *S. aureus*.

Uma colheita realizada a nível do canal auditivo externo não fornece qualquer informação sobre o agente causador de otites médias. Para isolamento dos agentes etiológicos respetivos, a timpanocentese é o procedimento a realizar. No laboratório de estágio, exsudados auriculares colhidos por esse procedimento são tratados como amostras de pús.

As amostras de exsudado do ouvido externo são colhidas com zaragatoas, as quais são diretamente utilizadas para preparação de lâmina, para coloração de Gram. Após preparação de suspensão da amostra, são semeados os meios PVX, CNA, MCK e COS, que se colocam na estufa a 37°C por 48h. Se houver crescimento que seja de valorizar, prosseguimos com identificação e testes de suscetibilidade antibiótica.

Nas amostras de pús, as bactérias encontradas fazem frequentemente parte da flora da pele ou de cavidades naturais. Desta forma, as amostras obtidas por timpanocentese têm que ser avaliadas considerando o local anatómico, o modo de infeção, o meio ambiente (p.ex. hospitalar) e o grau de contaminação das zonas adjacentes ou locais infeciosos, pois estes são fatores que influenciam o desenvolvimento de certas espécies bacterianas.

As amostras que chegam ao laboratório vêm em frascos ou seringas sem agulha, a partir das quais se preparam 2 lâminas, para Gram e ZN. Os meios semeados são o PVX, CNA, MCK e caldo BHI (para enriquecimento de microorganismos aeróbios exigentes), incubados por 48h a 37°C. Na presença de crescimento nas placas e considerando o exame microscópico, faz-se a devida valorização e prossegue-se com a identificação e antibiograma.

Caso Clínico

Uma criança de 3 anos, apresentava otorreia e histórico de otites de repetição. Chegou ao laboratório uma zaragatoa com a requisição de exame microbiológico do exsudado auricular.

A partir da zaragatoa preparou-se uma lâmina para coloração de Gram. Este exame microscópico permite uma identificação do tipo de microorganismos presentes, averiguar a sua relação com o processo infecioso em causa, assim como orientar desde logo a pesquisa cultural.

Neste caso, no Gram foram visualizados cocos gram positivos. A valorização destes vai depender do crescimento nas placas culturais, uma vez que organismos como *Staphylococcus* coagulase negativo e outros cocos positivos colonizadores da pele são comumente encontrados a colonizar o ouvido externo³.



Figura 8. Geloses COS, CNA e PVX (da esquerda para a direita), com crescimento de colónias beta-hemolíticas, a partir de amostra de exsudado auricular. (Fonte: Laboratório CML-GS CUF Viseu)

Semearam-se os meios PVX, MCK, CNA e COS, que se colocaram na estufa por 48h, a 37°C. PVX, CNA e COS em meios ricos em CO₂, e o MCK em aerobiose. O meio PVX, enriquecido com fatores X e V, permite o crescimento de bactérias exigentes como *Haemophilus* spp. O MCK destina-se ao isolamento seletivo de enterobactérias e outras bactérias gram negativas. O CNA é seletivo para cocos gram positivos e permite detetar hemólise. Por fim, o COS, que permite igualmente a deteção de hemólise.

Após as 48h fez-se a observação do crescimento. Não houve crescimento na gelose MCK, apenas nas restantes, nas quais se observaram colónias beta-hemolíticas (Figura 8).

Uma vez que estas geloses permitem crescimento de cocos gram positivos, é importante fazermos a prova auxiliar da catalase para distinguir entre *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

A prova da catalase consiste na adição de H₂O₂ e verificar se há a libertação de O₂ na forma de bolhas de ar. Esta é uma propriedade característica de *Staphylococcus* spp. mas não de *Streptococcus* spp. Para o caso em questão, o resultado foi negativo, pelo que se tratam de cocos do género *Streptococcus* spp.

Com base nas informações clínicas, microscópicas e culturais, e sabendo que uma das bactérias patogénicas mais frequentes em infeções de ouvido externo é o *S. Pyogenes*, estes resultados valorizam-se, prosseguindo-se com identificação e testes de suscetibilidade a antibióticos, no **Vitek 2 Compact**.

Após saída dos resultados, confirmou tratar-se de uma infeção por *Streptococcus pyogenes* e os resultados dos testes de suscetibilidade encontram-se no **Anexo I**.

No relatório de saída dos resultados para o clínico, não são apresentados todos os antibióticos testados. A sua seleção é feita de acordo com a idade, com o ambiente, a situação clínica e o tipo de infeção.

Nas infecções por *Streptococcus* do grupo A, os antibióticos de escolha são a Penicilina e Ampicilina, dos quais se sabe as resistências serem muito raras. De acordo com os resultados obtidos, observamos que as bactérias são sensíveis a estes grupos de antibióticos e podem ser recomendados ao clínico. Para o caso, optou-se pela Benzilpenicilina e/ou Amoxicilina+Ácido Clavulâmico.

V. Imunologia

No setor de Imunologia do CML-GS Viseu são determinados parâmetros que se podem dividir em: marcadores tumorais, endocrinológicos/hormonais, cardíacos, tiroideios e ainda os marcadores de doenças infecciosas (Imunoserologia).

Nesta área, o produto biológico mais utilizado é o soro. Se a amostra apenas tiver como objetivo a realização de análises imunológicas, após triagem, é centrifugada a 3000rpm/10min e levada diretamente ao setor de Imunologia. Quando a amostra já passou pelo setor de Bioquímica, é novamente centrifugada para que fique mais límpida, reduzindo a probabilidade de outras moléculas presentes interferirem com as técnicas de quantificação.

Neste setor já existe uma grande automatização, sendo que os parâmetros são determinados pelos equipamentos **ADVIA® Centaur XP** da **Siemens** e o **VIDAS®** da **BioMérieux**. Dada esta automatização, é de grande importância a realização e manutenção de controlos, manutenções e calibrações dos equipamentos. As calibrações são realizadas periodicamente, quando pedido pelo equipamento, ou quando há mudança de lote de reagentes. Os controlos são realizados diariamente, de acordo com um mapa onde estão assinalados quais os que devem ser feitos em cada dia.

O **ADVIA® Centaur XP** é um equipamento onde se realizam imunoensaios através de quimioluminescência, em que a luz emitida é proporcional à concentração de analito presente na amostra. O marcador quimioluminescente utilizado nesta metodologia é o Éster de Acridina. Os imunoensaios que o equipamento efetua podem ser de dois tipos, o imunoensaio do tipo *Sandwich* e o imunoensaio competitivo. Na Tabela abaixo estão indicados os parâmetros determinados no laboratório de estágio por tipo de imunoensaio.

Tabela III. Parâmetros determinados no **ADVIA® Centaur XP**.

Parâmetro	Tipo de imunoensaio
Anticorpo HBs, antígeno HBs, Anticorpo HCV, Ca125, CEA, HIV, Ferritina, PSA livre, PSA, TSH, FSH	Sandwich
FT3, T3, FT4 e Vitamina B12	Competitivo

O **VIDAS**[®] é um sistema automatizado de imunoensaio com base no princípio ELFA (Teste Imunoenzimático por fluorescência). Este equipamento está mais direcionado ao serviço de urgência do hospital, no entanto, também mede parâmetros de rotina. O laboratório considera como parâmetros de urgência a Troponina I, a Mioglobina, o NT-proBNP, a CK-MB (marcadores cardíacos), os D-Dímeros e a Procalcitonina (marcador de infecção bacteriana) e como parâmetros de rotina, a Gonadotrofina Coriônica Humana (β -HCG).

Na Imunologia, encontramos ainda um conjunto de testes que são realizados manualmente, os testes serológicos. Estes são realizados em soro humano, para detetar a presença de anticorpos gerados contra antígenos específicos de agentes infecciosos, através de reações de aglutinação. Estas reações permitem medir qualitativa e quantitativamente, os níveis de Antígeno e Anticorpo⁸. Os principais testes realizados no laboratório de estágio incluem:

- a) **VDRL/RPR Test:** teste não treponémico de deteção qualitativa e quantitativa de anticorpos Reaginas, associados à Sífilis.
- b) **TPHA:** Deteção de anticorpos anti *Treponema pallidum*. Este teste é mais sensível e específico no diagnóstico de sífilis.
- c) **Reação de Weil-Felix:** Deteção de anticorpos associados à infecção por *Rickettsia* por reação de aglutinação.
- d) **Reação de Widal:** deteção de infecção por bactérias do género *Salmonella spp.* com base na aglutinação de anticorpos presentes no soro, após adição de reagentes contendo os antígenos somático-O e flagelar-H.
- e) **Reação de Rose-Bengal:** Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* no soro de doentes com suspeita de Brucelose.
- f) **Reação Paul-Bunnell:** pesquisa de anticorpos heterófilos específicos de mononucleose infecciosa, doença provocada pelo vírus *Epstein Barr*.

Durante a minha passagem pela Imunologia tive oportunidade de integrar a rotina, realizar controlos e calibrações dos equipamentos, processar as amostras e acompanhar a validação dos resultados.

VI. Bioquímica

A Bioquímica fornece informações de diagnóstico e monitorização terapêutica, de despiste e prognóstico patológico.

A maioria dos laboratórios já se encontra automatizado, o que permite atingir um elevado nível de produtividade e melhoria na qualidade do serviço.

Para a realização das análises bioquímicas, é necessário que o laboratório receba a amostra adequada para o teste solicitado, assim como informação que garanta que o teste correto é realizado e que o resultado é devolvido ao clínico com o mínimo tempo de espera. A identificação do utente deve ser correta, as análises devem ser claramente indicadas e a requisição deve-se fazer acompanhar de informação clínica relativa à patologia suspeita.

As amostras mais comuns são o sangue venoso e o soro ou plasma, embora amostras de urina, fezes, sangue arterial, líquido cerebrospinal, aspirados, entre outras, também sejam utilizadas. As amostras de soro são colhidas em tubos de plástico que contêm um ativador de coágulo presente na parede e que acelera o processo de coagulação. Existem diferentes tamanhos, consoante o volume necessário para a realização dos testes pedidos, e identificam-se pela tampa vermelha ou amarela, no caso pediátrico. Quando o analito a analisar é instável, e é necessário o uso de plasma, o sangue é colhido para um tubo com anticoagulante, como a heparina, identificando-se pela tampa verde. Tubos com Fluoreto/EDTA são utilizados em dosagens de glucose e lactato no plasma. O fluoreto atua como inibidor glicolítico e o anticoagulante EDTA preserva a morfologia celular mantendo a qualidade da amostra. Estes identificam-se pela tampa cinza.

O sucesso dos testes depende de potenciais erros tais como, a técnica de colheita, estase prolongada durante a punção, volume insuficiente, recipientes inadequados ao teste, local de colheita e armazenamento inapropriado.

Na bioquímica, a maioria dos parâmetros determinados são quantitativos ou semi-quantitativos, correspondendo à quantidade de analito presente num pequeno volume de soro ou outro fluido biológico, ou seja, à sua concentração. As alterações nas concentrações analíticas podem-se dever a um aumento ou diminuição da síntese de analito ou porque o volume de fluido sofreu alterações⁹.

Os resultados são expressos de acordo com precisão e exatidão, sensibilidade e especificidade, garantia de qualidade e intervalos de referência. As técnicas do laboratório são responsáveis por controlar o desempenho dos ensaios através de amostras de controlo de qualidade, reassegurando que o método está a trabalhar de forma satisfatória as amostras dos utentes.

O controlo interno da qualidade é feito todos os dias e os valores obtidos são comparados com resultados anteriores e com os esperados, no sentido de se avaliar o desempenho do equipamento.

Mais do que a variação analítica associada ao equipamento, é necessário ter presente as variações biológicas, que na realidade têm muito mais impacto que as primeiras. A idade, o sexo, a dieta, o ciclo circadiano, a prática de exercício e o histórico clínico são alguns exemplos de fatores biológicos que afetam a interpretação dos resultados e que se devem ter em atenção⁹.

No laboratório CML-GS, CUF Viseu, pude acompanhar a validação dos resultados feita pelas técnicas, percebendo o impacto, tanto das variações analíticas como as biológicas, nos resultados obtidos. Além disto, realizei controlos de qualidade interna, calibrações e manutenções dos equipamentos e pude integrar a rotina desde a receção de amostras ao seu processamento.

a) Parâmetros Bioquímicos

É na Bioquímica que encontramos o maior fluxo de amostras, nomeadamente soro e urina. No laboratório CML-GS CUF Viseu são avaliados diversos parâmetros relacionados com as funções do organismo em equipamentos automatizados da **Siemens**, os **Dimension® RXL Max**.

O laboratório dispõe de dois destes equipamentos, sendo que um deles está mais direcionado para a determinação de parâmetros das amostras da rotina, e o outro, que deverá estar mais livre, às amostras que chegam do serviço de urgências do hospital.

A colheita das amostras de sangue é feita para tubos sem anticoagulante, com esferas ativadoras da coagulação e gel separador, os quais são centrifugados a 3000rpm/10min, passados não mais que 45 minutos após a colheita, de forma a obtermos o soro. A vantagem destes tubos deve-se à criação de uma barreira entre o soro e as células, produzindo não só um maior volume de soro isento de fibrina como prevenindo que o metabolismo celular que continua a ocorrer, induza a alterações em parâmetros como por exemplo a glucose.

Urinas ocasionais e urinas de 24h são também amostras muito comuns neste setor. Durante a triagem dos produtos faz-se a sua separação para tubos que irão centrifugar, para serem depois processadas.

Os **Dimension® RXL Max** executam as diversas determinações através de métodos espectrofotométricos, turbidimétricos e potenciométricos. A unidade de eléctrodos seletivos

de iões (ISE) é a que garante as determinações dos iões Na⁺, K⁺ e Cl⁻, por potenciometria, utilizando tecnologia de Multissensor Integrado (IMT) de deteção indireta de amostras QuikLYTE. Neste sensor, é desenvolvido um potencial elétrico proporcional à atividade de cada ião específico na amostra. Os restantes parâmetros são determinados com base em reações bioquímicas em que se mede a luz produzida pelos substratos consumidos ou produtos formados. A quantidade de luz absorvida ou a cor da solução, é proporcional à concentração da molécula de interesse em solução. Na espectrofotometria, mede-se a luz das soluções coradas e/ou não coradas. No último caso, mede-se a luz absorvida pelos nucleotídeos NAD e NADP nas formas oxidada e reduzida. Na espectrofotometria, o método pode ser colorimétrico – o produto final é corado- como acontece para o colesterol, glucose e triglicéridos, ou pode ser método UV – o produto final é incolor – utilizado em quantificações enzimáticas como a LDH e a CKI. Na turbidimetria, mede-se a turbidez das soluções, derivada de uma reação Ag-Ac. A presença de complexos insolúveis reflete ou dispersa a luz de um modo proporcional à concentração de imunocomplexos. Esta técnica é implementada nas determinações de transferrina, PCR e microalbuminúria, por exemplo.

Na Tabela IV encontram-se, divididos por funções metabólicas, os parâmetros bioquímicos determinados no laboratório de estágio pelos *Dimension® RXL MAX*. Estes serão abordados com mais detalhe em secções seguintes.

Tabela IV. Parâmetros Bioquímicos determinados pelo *Dimension® RXL Max*.

Função	Parâmetros Bioquímicos
Equilíbrio hidroeletrólítico	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻
Metabolismo Lipídico	Colesterol Total, LDL, HDL e Triglicéridos
Metabolismo dos glúcidos	Glucose
Metabolismo do Ferro	Ferro, Capacidade total de ligação do ferro, transferrina
Metabolismo Proteico	Proteína C Reativa, Albumina, Proteínas Totais séricas e urinárias
Metabolismo mineral e ósseo	Cálcio, Magnésio e Fosfato
Função Renal	Ureia, ácido úrico, creatinina e microalbuminúria
Função Hepática	AST, ALT, γ-GT, Fosfatase Alcalina, Bilirrubina Total e bilirrubina Direta
Função Pancreática	Amilase
Doenças Autoimunes	Fator Reumatoide
Doenças Infeciosas	Anticorpo anti-streptolisina O
Função Cardíaca	Creatina Cínase, Lactato desidrogenase

b) Equilíbrio hidroeletrolítico

A água é o principal constituinte do corpo humano, representando 60% da massa corporal. Esta constitui o meio em que os solutos orgânicos e inorgânicos estão dissolvidos e onde as reações metabólicas ocorrem.

Os quatro principais eletrólitos responsáveis pela regulação da homeostasia da água são o Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- .

Os eletrólitos dividem-se em aniões, carregados negativamente, e os catiões, carregados positivamente. O sódio é o principal catião do líquido extracelular, sendo o responsável por praticamente metade da força osmótica do plasma. O potássio é o principal catião intracelular, cujas concentrações elevadas são mantidas pela bomba Na^+/K^+ ATPase, em que, por consumo de ATP, o K^+ é transportado continuamente para o interior da célula, contra o seu gradiente de concentração. O cloreto é o principal anião extracelular, e tal como o sódio, tem um papel muito importante na manutenção da distribuição corporal de água, pressão osmótica e o equilíbrio anião-catião extracelular⁸.

No CML-GS a monitorização hidro-eletrolítica é feita através das determinações dos iões sódio, potássio e cloreto do ionograma.

Sódio

A concentração corporal total de sódio é o reflexo do equilíbrio entre o seu consumo e eliminação. O consumo de sódio depende da quantidade e tipo de alimentos ingeridos, e a sua eliminação ocorre a nível gastrointestinal, cutâneo e urinário. Em condições normais, a principal forma de excreção regulada deste catião é a nível renal, através do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que uma vez ativado atua promovendo a retenção de água e sódio.

O sódio acumula-se no organismo quando o seu consumo excede a sua eliminação, devido a anormalidades nos mecanismos de homeostasia, como por exemplo doença renal. Normalmente, esse aumento faz-se acompanhar de um aumento no volume de água extracelular. Já a depleção de sódio ocorre quando a eliminação excede a ingestão, como acontece em situações diarreicas.

Alterações nas concentrações totais de sódio não estão necessariamente associadas a alterações semelhantes a nível das suas concentrações no plasma, uma vez que estas últimas refletem o equilíbrio entre o Na^+ e água extracelular. Hiponatremia ocorre quando há um excesso de água extracelular relativamente ao Na^+ , ou um défice de Na^+ superior ao de água,

levando a diminuição nos seus níveis séricos. Na hipernatrémia, há um déficit de água superior ao do sódio, levando ao aumento das suas concentrações séricas¹⁰.

Potássio

O potássio encontra-se praticamente na sua totalidade no compartimento intracelular e a sua homeostase requer uma regulação tanto a nível da sua distribuição interna como externa.

A nível de distribuição interna, a regulação relaciona-se com a manutenção do elevado gradiente de concentração de K⁺ através da membrana celular, alcançado pelo transporte ativo de potássio para o interior da célula em troca com a saída de Na⁺.

O balanço externo diz respeito à regulação dos níveis corporais totais do ião, os quais dependem essencialmente do equilíbrio entre o consumo- tipo e quantidade de alimentos ingeridos- e a sua eliminação – a nível gastrointestinal, cutâneo e renal. No entanto, os seus níveis também são influenciados pela idade, sexo e massa muscular.

Tal como acontece com o sódio, também o rim é a única forma de excreção regulada do potássio, mantendo a sua homeostase. Um excesso de K⁺ corporal ocorre quando o consumo excede a eliminação, o que se verifica normalmente quando a sua excreção renal está comprometida. Já a depleção, ocorre quando a saída supera o consumo.

A hipocalémia, pode advir do movimento iónico para dentro da célula a partir do espaço extracelular, por excreção aumentada ou consumo diminuído. Pelas razões contrárias, ocorrem as situações de hipercalemias. Poderão ainda observar-se casos de pseudohipercalemias, em que os níveis plasmáticos reais estão normais, mas os níveis medidos estão falsamente aumentados¹⁰.

O doseamento de potássio é um dos parâmetros analíticos mais frequentemente testados em laboratório, e um dos mais sensíveis, quer a variações biológicas, quer a procedimentos pré-analíticos. Alguns fatores que contribuem para uma pseudohipercalemia incluem a ansiedade inerente à colheita, a hemólise, centrifugação inadequada, transporte inadequado e processamento tardio e medicação interferente com a bomba Na⁺/K⁺- ATPase.

Na validação: perante resultados de K⁺ alterados, a primeira medida a tomar é verificar se a amostra está hemolisada. Em caso afirmativo, é solicitada uma nova colheita porque os valores estão falsamente aumentados, devido à libertação do K⁺ intracelular eritrocitário.

Cloreto

O cloreto é o principal anião do compartimento extracelular, e as suas concentrações advêm do equilíbrio entre o seu consumo e eliminação, pelas mesmas vias que os restantes eletrólitos.

Na maioria dos casos, as causas de hipo e hiperclorémia são as mesmas que para hipo e hipernatrémias. Isto apenas não se verifica em situações de acidose e alcalose metabólica¹⁰.

c) Metabolismo Lipídico

Os lípidos são importantes fontes de energia, de hormonas, de componentes estruturais das membranas celulares e auxiliares da digestão. São moléculas hidrofóbicas, solúveis em líquidos orgânicos. No sentido de solucionar o seu transporte no plasma, surgem as estruturas esféricas, de núcleo hidrofóbico e revestimento hidrofílico, designadas de lipoproteínas. O seu núcleo é constituído por triglicerídeos e ésteres de colesterol, enquanto a superfície contém fosfolípidos, colesterol livre e proteínas – as Apolipoproteínas.

O metabolismo das lipoproteínas pode ser dividido em 2 vias, a exógena e a endógena. Na via exógena ocorre o transporte das gorduras da dieta para os tecidos periféricos, enquanto que na endógena, há o transporte de lípidos sintetizados no fígado para os locais onde serão utilizados nos tecidos periféricos.

As 4 principais lipoproteínas responsáveis pelo transporte/metabolismo lipídico são os quilomícrons, as VLDL, as LDL e HDL, classificadas consoante a sua densidade e diferentes em composição, estrutura e função⁹.

O significado clínico dos lípidos está sobretudo relacionado com o seu papel no desenvolvimento de doenças coronárias, nomeadamente a aterosclerose, e vários distúrbios lipoproteicos designados dislipidémias. As dislipidémias podem ser primárias, cuja origem é genética, ou secundárias, resultando de outras patologias existentes tais como cirrose hepática, síndrome nefrótica e diabetes mellitus.

É a associação causal das hiperlipidémias e da doença cardíaca coronária (DCC), que faz o diagnóstico laboratorial de lípidos e lipoproteínas plasmáticas tão importante. A aterosclerose é um distúrbio em que ocorre formação de placas na íntima das artérias coronárias, obstruindo o aporte de oxigénio e glucose para o miocárdio, aumentando o risco de DCC. A principal causa da aterogénese são os níveis elevados de LDL-C, baixos níveis plasmáticos de HDL-C e a hipertrigliceridémia⁹.

O diagnóstico de alterações no metabolismo das lipoproteínas e a sua monitorização tornam-se assim fulcrais à prevenção de risco.

Colesterol-Total (COL-T)

O colesterol é um lípido sintetizado a partir de Acetyl-CoA mas também pode ter origem na dieta. Este lípido é um componente estrutural essencial das membranas celulares, precursor

de ácidos biliares e hormonas esteroides e circula pelo organismo incorporado nas lipoproteínas.

Alguns dos fatores que afetam a concentração do colesterol plasmático incluem uma ingestão diária aumentada, dietas ricas em lípidos saturados, a ausência de insulina ou hormona da tiroide e distúrbios genéticos que comprometem o seu metabolismo¹¹.

O COL-T representa a soma de todas as lipoproteínas em circulação, permitindo ter uma visão geral do seu metabolismo, contribuindo para diagnóstico de dislipidémias e gestão do risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares.

HDL-C (High density lipoprotein)

Esta é a lipoproteína mais pequena mas também a mais densa, sendo constituída essencialmente por fosfolípidos e proteínas, sobretudo a Apolipoproteína A-I. As HDL são as responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, removendo o excesso de colesterol das células dos tecidos periféricos e devolvendo-o ao fígado, onde é metabolizado. Além dessa função, as HDL têm múltiplas outras atividades biológicas benéficas que as tornam anti-aterogénicas e marcadores negativos de risco cardiovascular. Têm atividade anti-inflamatória, anti-trombótica e a sua constituição em ApoA1 e Paraoxonase I tornam-nas antioxidantes, exercendo efeito protetor na oxidação das LDL. Regra geral, considera-se que os doentes com baixos níveis de colesterol HDL apresentam um risco acrescido de doença das artérias coronárias.

As medições de HDL-C são ferramentas úteis e utilizadas como meios auxiliares no diagnóstico de patologias lipídicas (ex. Diabetes mellitus), doenças hepáticas e renais e na avaliação do risco aterosclerótico e doença cardiovascular.

LDL-C (Low density lipoprotein)

As lipoproteínas LDL consistem em 80% de lípidos, sobretudo ésteres de colesterol, e 20% de proteínas, nomeadamente a Apo B-100. Esta lipoproteína é a principal forma de transporte de colesterol no organismo.

Os lípidos sintetizados no fígado são distribuídos pelos tecidos periféricos através das VLDL, que por ação da lipoproteína lipase se vão convertendo em moléculas de densidade baixa, as LDL. Esta lipoproteína é removida da circulação pela elevada afinidade da Apo B-100 com o recetor LDL e também por outras formas scavenger. Estas últimas são as responsáveis pela incorporação de LDL nas placas de ateroma em situações de níveis elevados de LDL⁹.

A determinação do LDL-C é feita através de cálculo, pela Fórmula de Friedwald. No entanto, tal só se aplica em situações em que os triglicerídeos se encontram iguais ou inferiores a 400mg/dL.

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - [\text{HDL} + (\text{Triglicerídeos}/5)]$$

Triglicerídeos

Os triglicerídeos são lípidos insolúveis em água, constituídos por 3 ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol. Estes são transportados no sangue como componentes nucleares de todas as lipoproteínas, nomeadamente nos quilomícrons e nas VLDL.

A sua função primária é fornecer energia à célula e por absorção no tecido adiposo, criar reservas de grandes quantidades de ácidos gordos, para que em situações de jejum seja possível a obtenção de energia.

Determinações dos níveis de triglicerídeos são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doentes com diabetes mellitus, obstrução hepática e outras doenças do metabolismo dos lípidos ou distúrbios endócrinos.

Na validação: quando se obtêm valores elevados, acima de 400mg/dL, é feita uma repetição na mesma amostra. Se os valores se confirmarem, solicita-se repetição de colheita com 12 a 14 horas de jejum.

d) Metabolismo dos glúcidos

Os carboidratos desempenham funções de componentes estruturais do RNA e DNA e como fonte de energia, nomeadamente através do metabolismo da glucose. A glucose deriva da hidrólise dos hidratos de carbono da dieta ou das reservas celulares (Glicogénio), ou ainda por síntese endógena, a partir das proteínas e glicerol dos triglicerídeos⁸.

Glucose

A concentração de glucose no sangue é regulada por hormonas como a insulina, o glucagon e a epinefrina, e as suas determinações são utilizadas no diagnóstico e tratamento de distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono, tais como a diabetes *mellitus*, a hipoglicémia neonatal e o insulinoma.

A diabetes *mellitus* é o distúrbio endócrino mais comum na prática clínica, caracterizado por hiperglicémia causada por resistência à insulina e/ou insuficiência absoluta ou relativa desta hormona. A diabetes pode ser primária, do tipo 1 ou do tipo 2, ou secundária, causada por

doença pancreática, endócrina, terapias farmacológicas ou anormalidades nos recetores de insulina.

No diagnóstico de diabetes mellitus, a presença de apenas um dos seguintes parâmetros é suficiente¹²:

- glicémia em jejum ≥ 126 mg/dL; ou
- glicémia ao acaso ≥ 200 mg/dL, na presença de sintomas; ou
- glicémia ≥ 200 mg/dL às 2 horas, na prova de tolerância à glucose oral (PTGO) com 75g de glucose; ou
- Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

O cut-off laboratorial de hipoglicémia é de valores de glucose inferiores a 70mg/dL, para utentes diabéticos. O valor de não diabéticos é variável. Além desta condição, a avaliação de situações hipoglicémicas depende da idade e se estamos perante uma situação de jejum ou pós-prandial.

A hipoglicémia não é diagnóstico mas sim um sinal bioquímico associado a vários grupos de doenças tais como insulinomas, doença de Addison e doença hepática⁹.

A hipoglicémia neonatal é uma das consequências de diabetes gestacional. O diagnóstico da diabetes gestacional pressupõe¹²:

- Na primeira consulta de gravidez, valores de glicémia de jejum, ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl.
- Se a glicemia de jejum for < 92 mg/dl, faz-se a PTGO com 75g de glucose às 24-28 semanas de gestação. É critério para o diagnóstico, a confirmação de um ou mais valores:
 - Às 0h, glicemia ≥ 92 mg/dl;
 - À 1h, glicemia ≥ 80 mg/dl;
 - Às 2h, glicemia ≥ 153 mg/dl.

e) Metabolismo do ferro

O ferro é um elemento essencial que se encontra distribuído pelo organismo na hemoglobina, mioglobina e outras hemoproteínas. Concentra-se sobretudo na hemoglobina dos eritrócitos ou nos seus precursores na medula óssea. Nos tecidos encontra-se armazenado na forma de ferritina (solúvel) e hemossiderina (insolúvel). A pequena percentagem presente no plasma está ligada à glicoproteína transferrina, a qual tem capacidade de ligar dois iões Fe^{2+} .

A regulação dos níveis de ferro é feita essencialmente através da regulação do seu consumo e os principais distúrbios no seu metabolismo são a sua deficiência ou excesso⁹.

Da deficiência de ferro decorre uma falha na síntese do grupo heme. Como a hemoglobina é fundamental no transporte de oxigénio aos tecidos, perante estas condições poderão ocorrer anemia e hipóxia tecidual. As principais causas de deficiência de ferro são as síndromes de mal absorção e perdas crónicas de sangue, as quais podem derivar de patologias intestinais ou presença de parasitas no intestino, por exemplo. Na gravidez, poderá observar-se uma diminuição do ferro devido às maiores necessidades maternas e fetais⁹.

O excesso de ferro pode ser provocado por transfusões sanguíneas repetitivas, hemocromatose e envenenamento.

Para avaliar o metabolismo férrico, no laboratório de estágio, fazem-se as determinações de ferro sérico, capacidade de fixação do ferro, saturação de transferrina e transferrina sérica.

Ferro

As medições do ferro são utilizadas no diagnóstico e monitorização do tratamento de doenças como a anemia por deficiência de ferro e outros distúrbios como a hemossiderose, hemocromatose e anemia sideroblástica.

Transferrina

A transferrina, ou siderofilina, transporta o ferro presente no sangue para os depósitos existentes no fígado, baço e medula óssea, assim como para órgãos que consomem ferro, nomeadamente os tecidos hematopoiéticos.

A síntese de transferrina ocorre no fígado e esta está dependente das concentrações séricas do ião. Quando há deficiência de ferro a sua síntese aumenta, e conseqüentemente aumentam as suas concentrações séricas. Em contrapartida, perante excessos de ferro a sua síntese é menor.

A determinação desta proteína é utilizada no diagnóstico de deficiência de ferro, latente e manifesta, e casos de sobrecarga de ferro.

TIBC (Total iron binding capacity)

A capacidade de fixação total do ferro é um teste para avaliar se o utente tem excesso ou falta de ferro no sangue. Dado que o ferro circula ligado à transferrina, este teste ajuda a perceber a quantidade dessa proteína disponível no sangue, para ligar o ião.

Valores de TIBC abaixo do normal são encontrados em anemias hemolíticas, perniciosas e falciformes e em hipoproteinémias. Valores elevados ocorrem quando as reservas de ferro do corpo estão diminuídas, como nas anemias por deficiência de ferro¹³.

$$\text{TIBC} = \text{Transferrina} \times (143/100)$$

Saturação de transferrina

Este é um parâmetro determinado quando a TIBC assume valores superiores aos níveis de ferro sérico, representando nada mais do que a razão entre esses 2 parâmetros.

$$\text{Saturação TRF} = (\text{Ferro} / \text{TIBC}) \times 100$$

f) Metabolismo Proteico

Albumina

A albumina é a principal proteína plasmática, sintetizada exclusivamente no fígado e atua como proteína de transporte e de ligação para ácidos gordos, bilirrubina, cálcio, vitaminas, elementos vestigiais e fármacos. É a principal responsável pela pressão colóide osmótica intra e extravascular.

A sua quantificação é essencial no diagnóstico e tratamento de diversas doenças que envolvem sobretudo o fígado ou os rins. Concentrações reduzidas podem ter origem em doença hepática, doença renal com perdas na urina, má nutrição ou dieta pobre em proteínas.

RPCR (intervalo alargado de proteína C reativa)

A PCR é uma das proteínas de fase aguda, produzida pelo fígado, cujos níveis séricos aumentam durante uma reação inflamatória desencadeada por processos infecciosos e não infecciosos, como a artrite reumatóide, doença cardiovascular e doença vascular periférica. Normalmente está presente apenas como componente vestigial do soro ou plasma, pelo que quando os seus níveis sobem acima do normal, proporcionam informações úteis no diagnóstico, terapêutica e monitorização de processos inflamatórios e doenças associadas.

No entanto, a PCR não é específica e não deve ser interpretada sem o contexto clínico do doente. Na avaliação do risco de doença cardiovascular e vascular periférica, as determinações devem ser comparadas com valores anteriores.

Proteínas totais no soro

Utilizadas no diagnóstico e tratamento de uma variedade de doenças que envolvem o fígado, o rim ou a medula óssea, assim como perturbações metabólicas ou nutricionais.

Alterações na sua concentração são comuns. Valores elevados podem significar a presença de paraproteína, e valores reduzidos, indicam que as concentrações de albumina estão diminuídas.

Proteínas urinárias

A proteinúria consiste na excreção anormal de proteínas na urina, associada a doença renal e cardiovascular. Com efeito, é utilizada no diagnóstico e tratamento dessas mesmas doenças. Permite identificar pacientes diabéticos com risco de nefropatia e outras complicações microvasculares, e prevê danos nos órgãos em doentes hipertensos.

Este parâmetro é sobretudo indicador de uma função glomerular anormal. No entanto, a presença de proteína em excesso, uma alteração da membrana glomerular, disfunção e secreção tubular, são também mecanismos que podem ser subjacentes à proteinúria⁹.

g) Metabolismo mineral e ósseo

O sistema esquelético armazena 99% do cálcio corporal. Os ossos são tecido conjuntivo mineralizado, nos quais o colagénio tipo I forma uma rede de fibras flexíveis. A mineralização desta rede, pelos sais de cálcio, é essencial à formação do esqueleto rígido⁸.

O metabolismo do cálcio é um processo bastante regulado, já que este desempenha papéis críticos na sinalização intracelular e no controlo das funções de proteínas extracelulares, como as da cascata de coagulação⁸. A sua regulação está interligada com a regulação do fosfato e, embora em menor extensão, com a do magnésio⁸.

Cálcio

No sangue, cerca de 50% do cálcio encontra-se na forma livre, 40% encontra-se ligado a proteínas e 10% na forma complexada. Do cálcio que se encontra ligado a proteínas, 80% está presente na albumina e o restante nas globulinas. A sua redistribuição pelos diferentes compartimentos depende de alterações nas concentrações de proteínas e pequenos aniões, alterações no pH ou nas quantidades de cálcio livre e total no soro⁸.

A fração livre é aquela com atividade biológica e cuja concentração no plasma é altamente regulada pela PTH (Hormona da Paratiroide) e 1,25-(OH)₂ D. O cálcio intracelular desempenha funções na contração muscular, secreção hormonal, metabolismo do glicogénio e divisão celular. O extracelular participa na mineralização óssea, coagulação sanguínea, estabilização das membranas celulares e alteração da permeabilidade e excitabilidade (diminuição de cálcio sérico leva a excitabilidade neuromuscular aumentada e tetania)⁸.

As suas determinações permitem o diagnóstico e tratamento de doença da paratiróide, doenças ósseas, doenças renais crónicas e tetania.

Magnésio

Aproximadamente 55% do Mg^{2+} corporal total encontra-se no esqueleto e 45% é intracelular, sendo aí o catião mais prevalente. Nas células, encontra-se ligado a proteínas e moléculas carregadas negativamente, como o ATP, enquanto que no plasma, circula na forma livre⁸.

O magnésio é cofator de inúmeras enzimas, essencial à formação de complexos de substratos enzimáticos e ativador alostérico de vários sistemas enzimáticos. A redução de magnésio sérico conduz a uma excitabilidade neuromuscular mais elevada, uma vez que este catião inibe competitivamente a entrada de cálcio nos neurónios⁸.

Fosfato

No plasma, o fosfato existe na forma de aniões mono e divalentes. No sangue, ésteres de fosfato orgânico localizam-se no interior das células, enquanto o inorgânico é o principal componente da hidroxiapatite do osso.

Nos tecidos moles, a maioria do fosfato é celular, orgânico e incorporado nos ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas e ATP. Também é um elemento essencial de nucleótidos cíclicos e NADP, sendo assim importante na atividade de várias enzimas⁸.

As medições de fosfato são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doença óssea, da paratiróide e renal.

h) Função Renal

A creatinina, a ureia e o ácido úrico são metabolitos proteicos não nitrogenados, eliminados do organismo pelo rim, após filtração glomerular. A sua quantificação no soro é normalmente utilizada como indicador de função renal.

Creatinina

A creatinina, geralmente, é considerada como a molécula mais útil na avaliação da função renal. As suas concentrações séricas são mantidas dentro de limites estreitos sobretudo devida à filtração glomerular.

Na maioria das doenças renais crónicas, as funções de excreção, endócrinas e metabólicas do rim, declinam. A Taxa de Filtração Glomerular (TFG) é utilizada como medida da capacidade de filtração renal, sendo amplamente aceite como o melhor índice de função renal.

Em avaliações iniciais de doença renal crónica é recomendado fazer-se uma estimativa da TFG, além das determinações séricas de creatinina. A TFG é aplicável à maioria das circunstâncias clínicas, no diagnóstico, estadiamento e acompanhamento da progressão da doença,

permitindo estabelecer os níveis de dosagem terapêutica eficazes. A clearance de creatinina pode igualmente ser utilizada para essa finalidade.

Ureia

A ureia é o resultado do catabolismo proteico e de aminoácidos por ação de enzimas hepáticas do ciclo da ureia e a sua eliminação ocorre sobretudo através dos rins.

A ureia é utilizada como indicador de função renal. O aumento na sua concentração plasmática pode-se dever a causas pré-renais, renais ou pós-renais, conferindo a este composto uma baixa especificidade renal, embora seja muito sensível.

Também vários fatores extra-renais influenciam as concentrações de ureia, o que limita o seu valor como teste de função renal. As suas concentrações podem aumentar, por exemplo, em dietas ricas em proteína, maior catabolismo proteico, desidratação e diminuição de perfusão renal. Nestas situações os valores de creatinina poderão estar normais, mas não os de ureia. Já em situações obstrutivas pós-renais como neoplasias, cálculos renais e hiperplasia benigna da próstata, verifica-se um aumento da concentração plasmática de ureia e creatinina⁸.

A principal utilidade na determinação do azoto ureico, reside assim, juntamente com a determinação da creatinina e na razão ureia:creatinina, em discriminar entre uma urémia pré- e pós-renal.

Ácido úrico

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, podendo ser encontrado em pequenas quantidades na urina e na forma de sais nas articulações, configurando o achado típico da gota.

A sua eliminação é renal e envolve 4 etapas: filtração glomerular, reabsorção tubular proximal, secreção tubular distal e reabsorção tubular distal. De toda a quantidade filtrada inicialmente, apenas 6-12% é eliminada⁸.

Uma hiperuricémia pode ocorrer devido a síntese aumentada de precursores de purinas ou a uma diminuição na sua excreção, a qual pode ser consequência de doença renal. Por outro lado, as hipouricémias podem dever-se a uma diminuição na síntese de purinas ou num defeito da reabsorção tubular renal.

O seu doseamento é importante no diagnóstico e monitorização de patologias renais, neurológicas e gota.

Microalbuminúria

O primeiro sinal de doença glomerular renal é muitas das vezes a microalbuminúria, que corresponde à presença de uma concentração urinária de albumina impossível de detetar com as tiras-teste.

As medições de albumina na urina são utilizadas na monitorização da nefropatia diabética, a qual apresenta três fases: nefropatia incipiente, quando aparece microalbuminúria (17-174mg/L) , a fase de nefropatia clínica, com a presença de macroalbuminúria (>174mg/L) e a fase mais adiantada de insuficiência renal.

A nefropatia diabética ocorre em 20-40% dos doentes com diabetes e é a principal causa de doença renal em fase terminal. A deteção de microalbuminúria em diabéticos significa nefropatia diabética precoce e desta forma permite tratamento de modo a inibir a progressão para lesão renal mais significativa⁹.

i) Função Hepática

O fígado desempenha importantes funções fisiológicas. Através da veia porta, todo o sangue do trato intestinal chega ao fígado, onde os produtos derivados da digestão são processados, transformados e armazenados. Este órgão tem um papel central no metabolismo proteico, lipídico e dos carboidratos, é responsável pela metabolização de compostos endógenos e exógenos através de biotransformação e desempenha ainda funções endócrinas, como o catabolismo do cortisol e vitamina D e síntese de angiotensinogénio, trombopoietina e pequenas quantidades de eritropoietina⁸.

Testes de função e integridade hepática são úteis na deteção, diagnóstico, avaliação de severidade, monitorização de terapêutica e avaliação do prognóstico de doença e disfunção hepática⁸.

Aminotransferases

As transaminases são enzimas presentes no citosol dos hepatócitos, libertadas na sequência de lesões hepatocelulares. As atividades da AST e da ALT são amplamente utilizadas na prática clínica devido à sua sensibilidade. No entanto, são pouco específicas de lesão hepática aguda, independentemente da etiologia.

Elevações significativas são observadas em doenças hepáticas como hepatite, necrose e cirrose.

Na validação: quando se observam valores elevados há que fazer a sua comparação com marcadores cardíacos e hepáticos. Se houver uma incongruência, é necessário fazer repetição da análise na mesma amostra.

- **AST (Aspartato-Aminotransferase)**

É uma enzima que se localiza no citosol e mitocôndrias, não só dos hepatócitos, mas também no músculo cardíaco, esquelético, rins e cérebro. Desta forma, esta enzima pode estar associada a patologias em outros tecidos, devendo fazer-se a sua avaliação paralelamente a outros parâmetros bioquímicos.

Na validação: a AST é uma enzima muito sensível a situações de hemólise dada a sua presença no interior das hemácias. Perante valores elevados, é necessário avaliar se a amostra se encontra hemolisada.

- **ALT (Alanina-Aminotransferase)**

A ALT está presente, quase exclusivamente, no fígado, e em situações de perturbações hepáticas tende a aumentar mais do que a AST. Sendo uma enzima mais específica, é um bom marcador de lesão hepatocelular.

Fosfatase Alcalina (ALP)

É uma enzima membranaar, presente nos ductos biliares.

Um aumento da atividade da fosfatase alcalina pode ocorrer na sequência de uma síntese aumentada da enzima pelas células dos canálculos biliares, normalmente em resposta a colestase, intra ou extra hepática. Um aumento da sua atividade também se poderá manifestar em doenças infiltrativas do fígado ou cirrose⁹.

No entanto, esta enzima não é específica de lesão hepática. Encontra-se também presente em concentrações significativas noutros órgãos, nomeadamente no osso, intestino delgado, placenta e rins⁹. Assim, a avaliação da sua atividade deve ser feita em paralelo com outros marcadores como a AST, ALT, γ -Gt, e tendo em atenção a clínica do utente, dado que a ALP sofre alterações fisiológicas com a idade e gravidez.

Mais do que utilizada no diagnóstico e tratamento de doenças hepáticas, também é importante em doenças ósseas associadas com aumento da atividade osteoblástica, da paratiroide e intestinais.

γ-Gt (Gama Glutamil-Transferase)

A γ -Gt está presente no túbulo proximal renal, fígado, pâncreas e intestino. Encontra-se no citoplasma, mas a maior fração está presente na membrana celular e é responsável por transportar aminoácidos e peptídeos para a célula através da membrana. A γ -Gt é crítica na manutenção de níveis intracelulares adequados de glutatona reduzida, uma importante molécula antioxidante⁸.

A sua atividade no plasma aumenta aquando de lesões hepáticas agudas e em situações de colestase. Também é afetada pela ingestão de álcool etílico e certos medicamentos. Esta enzima é um indicador muito sensível de patologia hepática⁹.

Bilirrubina

A bilirrubina resulta do catabolismo da hemoglobina, sendo um metabolito derivado do grupo heme. A sua produção inicia-se com a transformação do grupo heme em bilirrubina, uma molécula insolúvel em água e que por isso se liga à albumina (bilirrubina não conjugada) e é transportada para o fígado. Nos hepatócitos, a bilirrubina é rapidamente conjugada com o ácido glucorónico (bilirrubina conjugada) de forma a ser eliminada na bÍlis.

No intestino, a bilirrubina conjugada sofre hidrólise por ação de enzimas, as beta-glucoronidases, sendo depois reduzida pela microbiota anaeróbia intestinal formando estercobilinogénio, a maioria do qual é eliminado nas fezes. Uma parte é reabsorvida e eventualmente re-excretada através da bÍlis, e pequenas quantidades estão presentes também na urina, na forma de urobilinogénio⁹.

Quando o trato biliar é bloqueado, a bilirrubina não é excretada e as suas concentrações séricas aumentam. No entanto, também a hemólise e falha nos mecanismos de conjugação nos hepatócitos conduzem a um aumento da sua concentração plasmática⁹. Desta forma, a quantificação da bilirrubina não só é utilizada no diagnóstico e tratamento de perturbações hepáticas, como também hemolíticas, hematológicas e metabólicas.

As hiperbilirrubinémias que ocorrem à custa do aumento da forma não conjugada são sobretudo causadas por lesões nas hemácias, como nas anemias hemolíticas. Por outro lado, as hiperbilirrubinémias que ocorrem por aumento da forma conjugada devem-se a obstruções biliares de origem intra-hepática, como intoxicação medicamentosa ou cirrose biliar primária, ou extra-hepática, como pancreatites ou cálculos biliares.

No laboratório de estágio são feitas as determinações da bilirrubina conjugada e total. A forma não conjugada pode ser obtida fazendo a subtração das duas mencionadas anteriormente.

j) Função Pancreática

O pâncreas é uma glândula mista, contendo uma porção endócrina e exócrina. A porção exócrina é constituída por ácinos produtores de suco pancreático e por um sistema de canais que o transporta até ao intestino delgado, onde vai desempenhar as suas funções na digestão proteica, lipídica e dos carboidratos. A porção endócrina é composta pelos ilhéus pancreáticos, produtores das hormonas insulina, glucagina e somatostatina.

Os marcadores séricos mais utilizados na investigação e tratamento de doença pancreática, sobretudo pancreatite aguda, são as enzimas digestivas amilase e lipase. No laboratório de estágio, apenas é feita a determinação da amilase.

Amilase

A amilase é uma enzima pequena o suficiente para atravessar o glomérulo renal, sendo fisiologicamente a única enzima plasmática encontrada na urina. A amilase é produzida nos ácinos pancreáticos mas também pelas glândulas salivares, ovários, pulmões e tecido adiposo. A amilase salivar e pancreática é designada de alfa-amilase, a forma predominante encontrada no soro e urina⁸.

Embora não seja específica, a atividade enzimática total está significativamente aumentada nas pancreatites agudas. O aumento ocorre 5 a 8 horas após o início dos sintomas e os valores regressam ao normal passados 3-4 dias. A magnitude do aumento da sua atividade não está relacionada com a severidade da doença pancreática, no entanto, quanto maior o aumento, maior a probabilidade de se tratar de uma pancreatite aguda⁸.

k) Doenças Autoimunes: Fator reumatoide

As doenças reumáticas inflamatórias são bastante variáveis na sua expressão fenotípica, no entanto, têm em comum a presença de inflamação e consequente lesão de tecidos conjuntivos. Estas doenças podem ser agudas, em que a causa é exógena e a doença é autolimitada, ou podem ser crónicas, em que a evolução da doença se deve a uma resposta auto-imune que induz um ciclo auto-amplificante de lesão¹⁴.

Artrite reumatóide, gota e lúpus eritmatoso sistémico são algumas das doenças reumáticas inflamatórias, cujo diagnóstico, monitorização terapêutica e prognóstico, podem ser avaliados através do Fator Reumatoide. O fator reumatoide é um auto-anticorpo contra a IgG humana frequentemente encontrada no soro em altas concentrações em certas patologias, nomeadamente a artrite reumatoide.

l) Doenças infecciosas: anticorpo anti-streptolisina O

Streptococcus pyogenes é um agente patogénico exclusivamente humano, que pode colonizar a orofaringe e/ou a pele, causando infeções supurativas como a faringite, e não supurativas como a febre reumática. A virulência desta bactéria é determinada pela capacidade de evasão da fagocitose, adesão e invasão das células hospedeiras e produção de toxinas, entre as quais, a estreptolisina O¹.

A estreptolisina O é uma exotoxina/hemolisina lábil ao oxigénio, capaz de lisar as células sanguíneas. A maioria das pessoas infetadas com streptococos hemolíticos produz anticorpos anti-estreptolisina O (ASO), contra o antígeno estreptolisina O. Assim, a determinação de anticorpos anti-estreptolisina é útil no diagnóstico, tratamento e monitorização da progressão de doença como a febre reumática, glomerulonefrite aguda, escarlatina e amigdalite.

m) Função Cardíaca

A doença isquémica aguda e a insuficiência cardíaca congestiva são as doenças cardiovasculares que mais dependem de diagnóstico bioquímico. O enfarte agudo do miocárdio representa a doença isquémica aguda com pior prognóstico e ocorre quando há desequilíbrio entre a entrega e a necessidade de oxigénio ao músculo cardíaco, o que resulta em lesão, ou mesmo morte dos miócitos⁸.

A aterosclerose é a principal causa de enfarte agudo do miocárdio. Com a formação das placas de ateroma, há uma diminuição do lúmen arterial, o que significa, menor perfusão coronária. Se uma placa instável romper, o seu conteúdo precipita e ocorre trombose. A trombose pode levar à oclusão completa da artéria afetada e/ou ao enfarte da região do miocárdio que essa suprimia⁹.

Na avaliação da função cardíaca podemos considerar 2 grupos de testes:

- 1) os funcionais, que incluem o eletrocardiograma e técnicas de imagem;
- 2) os testes laboratoriais, com pesquisa de marcadores de lesão e função do miocárdio. Dentro dos marcadores de lesão encontram-se as enzimas e proteínas estruturais cardíacas tais como a creatina cinase e a lactato desidrogenase, dois parâmetros avaliados no laboratório de estágio.

Creatina cinase

Creatina cinase (CK) é uma enzima que se encontra presente no músculo cardíaco, esquelético e no cérebro. Esta apresenta 3 isoenzimas, sendo a CK-2 (CK-MB) aquela que predomina no miocárdio.

A atividade de CK total e da isoenzima MB, após enfarte agudo do miocárdio, são utilizadas como marcadores bioquímicos de diagnóstico. A CK-2 tem excelente sensibilidade para situações de enfarte, mas é inespecífica, sendo que aumentos também se verificam em doenças musculares crônicas como distrofias e polimiosites, e também em situações de exercício físico extremo.

Ao utilizar enzimas no diagnóstico torna-se fundamental considerar a cinética da sua liberação, a janela de tempo em que faz sentido as suas determinações. Para a CK-MB, os seus aumentos verificam-se 4 a 8h após os primeiros sintomas de enfarte, atingindo um pico entre as 18-24h.

Lactato desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase está presente no citoplasma de todas as células do organismo, sendo as suas concentrações nos tecidos, centenas de vezes superiores às do soro. Mesmo uma pequena quantidade de lesões nos tecidos pode provocar um aumento na atividade de LDH, o que a torna útil no diagnóstico e monitorização de doenças em que a renovação dos tecidos é acelerada, como em doenças hepáticas, do músculo cardíaco, esquelético, dos rins e eritrócitos.

Assim, elevações séricas da sua atividade são encontradas numa variedade de condições incluindo o enfarte agudo do miocárdio, hepatites, hemólise e perturbações musculares e pulmonares⁸.

A sua atividade sérica aumenta dentro de 12 a 24h, atingindo o pico às 48h. Os seus níveis podem persistir por mais do que uma semana após a CK ter regressado ao nível normal, e o seu aumento é proporcional à extensão do enfarte.

Apesar do seu aumento em episódios de enfarte do miocárdio, a LDH não é específica e por si só não tem valor diagnóstico, devendo ser avaliada juntamente com outros marcadores bioquímicos.

Na validação: perante valores elevados de LDH, avaliar se a amostra está hemolisada, criando resultados falsamente aumentados.

n) Eletroforese Proteica

Além dos equipamentos automatizados da **Siemens**, no setor de bioquímica existe ainda o **Minicap** da **Sebia**. Este é responsável pela eletroforese de proteínas séricas, um método que consiste na separação das proteínas totais do soro, de acordo com o seu peso molecular e carga elétrica.

As proteínas normais do soro separam-se em seis frações principais: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-1-globulina, beta-2-globulina e gamaglobulina. Estas estão envolvidas em inúmeros processos bioquímicos fundamentais ao normal funcionamento do organismo, pelo que alterações ao perfil eletroforético podem assinalar patologias de variadas etiologias.

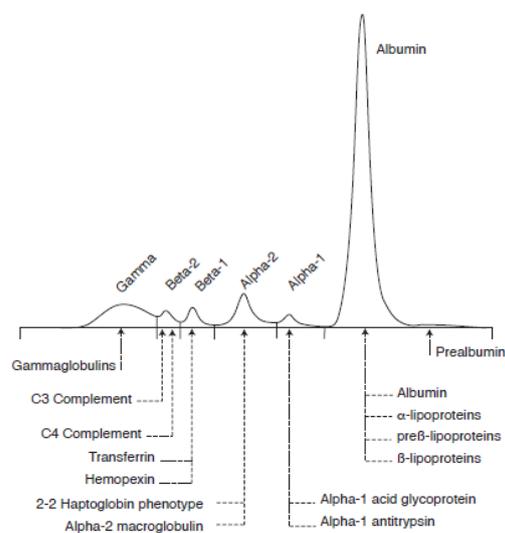


Figura 9. Proteinograma eletroforético normal. (Fonte: Manual Minicap Protein(E) 6 da **Sebia** de 2019/12)

Os perfis que mais se observam são as gamapatias mono e policlonais. As monoclonais estão associadas a patologias neoplásicas enquanto que as policlonais estão associadas a processos infecciosos e/ou inflamatórios¹⁵.

As gamapatias monoclonais incluem um grupo de patologias do sistema hematopoiético que resultam da proliferação de um só clone de linfócitos B. Cursam com a produção de uma proteína monoclonal no soro e/ou na urina (proteína de Bence-Jones). Além do Mieloma Múltiplo, também a Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado e a Macroglobulinémia de Waldenström podem ser a causa por detrás da condição monoclonal¹⁶.

Caso Clínico

Utente do sexo masculino deu entrada no serviço de urgências do Hospital CUF de Viseu, com queixas de náuseas e dor no quadrante superior direito. Partindo destes sintomas, consideraram-se algumas das causas de dor no quadrante superior direito, permitindo que o diagnóstico diferencial fosse com foco em patologia hepatobiliar, urinária, pancreática ou cardíaca.

O médico responsável solicitou ao laboratório resultados a alguns parâmetros que se consideram de rotina quando se trata de avaliar a origem da dor abdominal. Estes incluem o **hemograma completo**, uma **análise sumária de urina**, **eletrólitos**, **ureia** e **creatinina**,

amilase e lipase, bilirrubina direta e total, a fosfatase alcalina, as aminotransferases séricas e a lactato desidrogenase. Os resultados são apresentados nas Tabelas que se seguem (V, VI, VII e VIII).

Tabela V. Resultados Bioquímicos/Imunológicos obtidos de amostra de soro do utente.

Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Urémia	41 mg/dL	<50
Creatininémia	1,03 mg/dL	0,70-1,30
Desidrogenase Láctica (LDH)	526 U/l	85-227
AST	661 U/l	15-37
ALT	490 U/l	16-63
GGT	462 U/l	15-85
Fosfatase Alcalina	178 U/l	46-116
Bilirrubinémia Total	5,45 mg/dL	0,20-1,00
Bilirrubinémia Direta	2,37 mg/dL	0,00-0,20
Bilirrubinémia Indireta	3,09	0,20-0,80
Amilasémia	41 U/l	25-115
Troponina I	8 ng/l	<19
Natrémia	134,0 mmol/l	136,0-145,0
Kaliémia	3,6 mmol/l	3,5-5,1
Clorémia	100,0 mmol/l	98,0-107,0
Glicémia	115 mg/dL	70-110
Proteína C Reativa	5,661 mg/dL	0,050-1,000

Tabela VI. Resultados da análise sumária de urina.

Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
pH	5,5	
Densidade	1.020	1,010-1,025
Nitritos	Negativo	
Proteínas	30	≤20
Glicose	>1000	
Corpos cetônicos	5	
Urobilinogénio	8,0	
Bilirrubina	1,0	
Hemoglobina	0,03	
Leucócitos	Negativo	

Tabela VII. Resultados do exame microscópico do sedimento urinário.

Parâmetro	Resultado
Células Epiteliais	Algumas
Leucócitos	1-5/campo
Eritrócitos	0-3/campo

Tabela VIII. Resultados laboratoriais do hemograma completo.

Parâmetro	Resultado	Valores de Referência
Hemoglobina	16,1 g/dl	13,0-17,0
Eritrócitos	5,59 $\times 10^6$ / μ l	4,50-5,50
Hematócrito	45,7%	40,0-50,0
V.G.M.	81,8 fl	80,0-97,0
H.G.M.	28,8 pg	27,0-32,0
C.M.H.G.	35,2 g/dl	32,0-36,0
R.D.W.	12,6 %	11,6-14,0
Leucócitos	$4,4 \times 10^3$ / μ l	4,0-10,0
Neutrófilos	95,1 % / $4,19 \times 10^3$ / μ l	40,00-80,00
Eosinófilos	0,0 % / $0,00 \times 10^3$ / μ l	1,00-6,00
Basófilos	0,2% / $0,01 \times 10^3$ / μ l	0,00-2,00
Linfócitos	2,9% / $0,13 \times 10^3$ / μ l	20,00-40,00
Monócitos	1,8% / $0,08 \times 10^3$ / μ l	2,00-10,00
Plaquetas	101 $\times 10^3$ / μ l	150-400

Observando os resultados analíticos, rapidamente se identifica uma patologia hepatobiliar. Os marcadores de lesão hepatocelular (AST, ALT e LDH) elevados, juntamente com o marcador de inflamação, a PCR, remetem para uma **hepatite**. A γ -Gt é uma enzima que se caracteriza pela sua sensibilidade perante alterações hepáticas, sendo assim mais um indicador de lesão nos hepatócitos, quando se encontra elevada. Os aumentos de γ -Gt, juntamente com os da fosfatase alcalina e bilirrubina total, atuam como importante marcador de **colestase**.

A coexistência dos achados de hepatite e de colestase começam a ser sugestivos de um caso de **hepatite colestática**¹⁷.

Para além dos aumentos nos parâmetros enzimáticos, o hematócrito normal, a bilirrubina direta e indireta aumentadas e a presença de bilirrubina e urobilinogénio na urina, são tudo características comuns em casos de lesão hepatocelular¹⁴. Novamente, e olhando para as tabelas, tudo vai de encontro a uma patologia hepatobiliar.

No que toca à hiperbilirrubinémia, o aumento da bilirrubina direta, deriva da diminuição da sua excreção através do trato biliar. Remetendo, mais uma vez, para uma **colestase**. O aumento da bilirrubina indireta é o principal indicador de uma função hepática alterada: ou porque há uma maior produção de bilirrubina e a conjugação hepática não consegue acompanhar essa produção ou porque há uma efetiva perda na capacidade de conjugação devido à lesão das células. De realçar, a presença de bilirrubina e urobilinogénio na urina, característicos de situações em que há uma menor excreção através da bÍlis.

Assim, conjugando toda esta informação, o diagnóstico diferencial vai ficando mais direcionado. Há uma colestase que induziu ao aumento da bilirrubina direta. A acumulação da bilirrubina, com o evoluir da situação, leva a lesões nos hepatócitos, que veêm a sua função

diminuída. Isso contribui para o aumento da bilirrubina indireta, a qual não é possível conjugar eficazmente. O aumento desta também se relaciona com a perda de função de síntese. A menor síntese de albumina, que é a proteína transportadora de bilirrubina para o fígado, promove a sua acumulação em circulação. Pelas mesmas razões, no que toca a perda de função de síntese, surge ainda a trombocitopenia apresentada pelo utente.

A presença da PCR elevada indica uma situação inflamatória. Esta não surge associada a uma causa infecciosa uma vez que não há leucocitose nem leucocitúria. A amilase normal exclui patologia pancreática. Urémia, creatininémia e ionograma normais excluem patologias renais e/ou metabólicas. A Troponina-I normal exclui a patologia cardíaca. Assim, a condição inflamatória será de origem hepatobiliar, nomeadamente da inflamação da vesícula biliar, por uma obstrução dos ductos.

Com base nos resultados analíticos e sintomas apresentados suspeita-se assim de uma hepatite colestática. Posteriormente, exames de imagem teriam que ser realizados para confirmação.

O diagnóstico final é feito pelo clínico, conjugando toda a informação: história clínica, exame físico, resultados laboratoriais e exames imagiológicos.

VII. Hematologia

A Hematologia é a área na qual se estuda a hematopoiese, os órgãos hematopoiéticos e a hemostasia. Através da análise qualitativa e quantitativa dos elementos figurados do sangue, da velocidade de sedimentação, coagulação e visualização de esfregaços sanguíneos ao microscópio, é possível detetar e caracterizar patologias hematopoiéticas.

No laboratório CML-GS Viseu são determinados os parâmetros do hemograma (eritrograma, leucograma e trombocitograma), contagem de reticulócitos, a velocidade de sedimentação eritrocitária (VS), a hemoglobina glicada (HbA1c) e parâmetros de coagulação (Tempo de Protrombina (TP) e tempo de Tromboplastina parcial ativada (aPTT)).

Os tubos com EDTA são utilizados para a realização das análises de hemograma, velocidade de sedimentação e hemoglobina glicada. Os tubos com citrato de sódio são utilizados nos estudos de coagulação.

O laboratório dispõe de 2 equipamentos para realização do hemograma, o **Sysmex XN-550** e o **Sysmex XN-1000**. O **Sysmex XN-1000** além do hemograma faz a contagem de reticulócitos. Este equipamento é utilizado sobretudo para o serviço de urgência do hospital e análise de amostras que possuem mais do que o hemograma, pois como é mais rápido, torna

todo o serviço mais rápido e eficaz. Quaisquer alterações no hemograma são detetadas e reportadas, e se assim se justificar é realizado um esfregaço sanguíneo para observação microscópica. A coloração utilizada é a coloração de Wright, uma técnica eletiva que permite diferenciar os tipos celulares do sangue periférico.

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VS) determina a velocidade com que os eritrócitos sedimentam numa suspensão de plasma. Na presença de uma condição que provoque inflamação ou dano celular, os eritrócitos tendem a aglutinar-se, o que os torna mais pesados, sedimentando mais rapidamente. No entanto, fatores como a gravidez, sexo e idade são condições fisiológicas que se fazem sentir nos resultados. No laboratório de estágio, a VS é um parâmetro determinado no equipamento **Ves-Matic Cube 30**, que em 30 minutos fornece os resultados.

Situações hiperglicémicas conduzem à ligação não enzimática de glucose a uma variedade de proteínas. Essa ligação é irreversível em condições fisiológicas e as concentrações de proteínas glicadas traduzem a média de glucose sanguínea durante a vida dessa proteína. Assim, a hemoglobina glicada (HbA1c) reflete a média glicémica nos últimos 2 meses⁹. Este parâmetro é utilizado sobretudo no acompanhamento de pacientes diabéticos e no CML-GS é determinado pelo **Hb9210 Premier**.

É no **Sysmex CA-500** que a hemóstase é avaliada, através das provas de coagulação do Tempo de Protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Relativamente ao tempo de Protrombina, o resultado é expresso segundo o *International Normalized Ratio* (INR) a fim de uniformizar os resultados.

Ao longo da minha experiência neste setor pude realizar manutenções e controlos internos de qualidade dos equipamentos, processamento das amostras, preparação de esfregaços de sangue e a sua coloração, assim como a visualização de algumas lâminas.

Conclusão

A realização do estágio foi uma experiência muito enriquecedora, da qual levo vários ensinamentos para o meu futuro profissional.

Algo de extrema importância é a realização de todas as tarefas ao longo do processo analítico, com o maior rigor e responsabilidade, de modo a oferecer a qualidade no diagnóstico. Percebi também a importância em integrar os conhecimentos de todas as valências das Análises Clínicas, para uma validação adequada dos resultados. Além disto, é fundamental que os profissionais tenham espírito de equipa e entreajuda, contribuindo para respostas mais adequadas e atempadas.

Uma das dificuldades que se faz sentir nas fases analítica e pós-analítica é a falta de comunicação entre o clínico e o laboratório. A informação clínica é de extrema importância na validação dos resultados, para que estes sejam o mais rigorosos possível. Desta forma, isto deverá ser um aspeto a melhorar num futuro próximo.

Em suma, considero que a realização deste estágio foi enriquecedora não só a nível profissional como pessoal, e saio do mesmo com mais experiência laboratorial, mais confiança e conhecimento para os desafios que se avizinham.

Referências

- [1] MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - *Microbiologia Médica*. 7. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2014. ISBN 978-85-352-7978-8.
- [2] BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno - *Microbiologia Médica I*. Lisboa : LIDEL - Edições Técnicas, Lda, 2014. ISBN 978-989-752-057-0.
- [3] PROCOP, Gary W. ; *et al* - **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 7.^a ed. Philadelphia : Wolters Kluwer Health, 2017. ISBN 9781451116595.
- [4] XAVIER, Ricardo M. ; ALBUQUERQUE, Galton De C. ; BARROS, Elvino - **Laboratório Na Prática Clínica**. [S.l.] : Artmed Editora, 2005. ISBN 9788536303529.
- [5] FONSECA, Ana Bruschy *et al*. - Orientações para elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - 40. (2004).
- [6] **Laboratory Testing | MRSA | CDC**. [Consult. 17 Dez. 2022]. Disponível em https://www.cdc.gov/mrsa/lab/index.html#anchor_1548442775
- [7] João BENTO *et al*, Métodos diagnósticos em tuberculose, *Acta Med Port*. 2011; 24(1): 145-154.
- [8] BURTIS, Carl A. ; BRUNS, David E. - **TIETZ FUNDAMENTALS OF CLINICAL CHEMISTRY**. 7.^a ed. St. Louis, Missouri : Elsevier Saunders, 2015. ISBN 978-1-4557-4165-6.
- [9] GAW, Allan ; *et al* - **Clinical Biochemistry An Illustrated Colour Text**. 5.^a ed. [S.l.] : Churchill Livingstone Elsevier, 2013. ISBN 978-0-7020-5179-1.
- [10] KAPLAN, Lawrence A. ; PESCE, Amadeo J. - **Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation**. 5.^a ed. [S.l.] : Mosby, 2009. ISBN 0323036589.
- [11] HALL, John E. - **Tratado de Fisiologia Médica**. 12.^a ed. Rio de Janeiro : Saunders Elsevier, 2011. ISBN 978-85-352-4980-4.
- [12] Direção Geral da Saúde. Diagnóstico e Classificação da Diabetes *Mellitus*. Norma da Direção Geral da Saúde I-13 (2011).
- [13] **TIBC**. [Consult. 26 Jan. 2023]. Disponível em <https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/total-iron-binding-capacity>.

[14] MCPHEE, Stephen J. ; GANONG, William F. - **Fisiopatologia da Doença: Uma Introdução à Medicina Clínica**. 5.^a ed. Porto Alegre : AMGH Editora Ltda., 2011. ISBN 978-85-7726-010-2

[15] GONÇALVES DOS SANTOS, Patrícia Isabel Martins - **Avaliação da incidência de Gamopatias Monoclonais nos doentes da área do Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, EPE**. [S.l.] : Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, 2009. Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas.

[16] CUNHA, Sara Margarida da Conceição - **Gamopatias monoclonais : biologia, clínica e diagnóstico diferencial**. [S.l. : s.n.], 2012. Master's thesis. [Consult. 26 Fev. 2023]. Disponível em <http://hdl.handle.net/10316/81288>

[17] KUMAR, Vinay ; ABBAS, Abul K. ; ASTER, Jon C. - **Robbins, Patologia Básica**. 9.^a ed. Rio de Janeiro : Saunders Elsevier, 2013. ISBN 978-85-352-6294-0

Anexo

Anexo I- Relatório emitido pelo **Vitek 2 Compact**, após realização das provas de identificação e suscetibilidade das colônias beta-hemolíticas obtidas a partir do exsudado auricular. (**Fonte:** Laboratório CML-GS CUF Viseu)

Relatório do Laboratório					
Cliente Biomérieux Nº de Sistema: Isolado: HVP92114495-1 (Aprovado) Tipo de carta: GP Código de barra: 2422265403011396 Aparelho de teste: 090012C570F8 () Tipo de carta: AST-S101 Código de barra: 5422030203490628 Aparelho de teste: 090012C570F8 () Técnico: Vitek2.Vitek2@vittek2.com			Impresso por: vitek2		
Biomérieux: 05341234431671 Quantificação de microrganismos:					
Microrganismo Selecionado: Streptococcus pyogenes					
Comentário:					
Informações da Identificação					
Carta:	GP	Nº de Lote:	2422265403	Data de Validade:	8/Fev/2024 12:00 GMT
Estado:	Final	Hora da Análise:	4,82 Horas	Concluído:	10/Jan/2023 23:21 GMT
Origem do microrganismo: VITEK 2					
Microrganismo Selecionado: 97% Probabilidade Streptococcus pyogenes Biomérieux: 05341234431671 Confiança: Excelente identificação					
Microrganismos de Análise e Testes a Separar:					
Menção da Análise: A resistência de alto nível à gentamicina (CMI > 128 mg/L), é normalmente causada pela produção de uma enzima APH(2)-AAC(6) bifuncional que determina a perda de sinergia de todos os aminoglicosídeos (exceto a estreptomicina e arbecarcina) com β-lactâmicos e glicopéptidos independentemente dos valores de CMI.					
Contradizem o(s) Perfil(o) Biológico(s) Tipo(s): Streptococcus pyogenes CDEX(7).					
Informações de Suscetibilidade					
Carta:	AST-S101	Nº de Lote:	5422030203	Data de Validade:	18/Jun/2023 13:00 BST
Estado:	Final	Hora da Análise:	10,45 Horas	Concluído:	11/Jan/2023 05:00 GMT
Antibiótico	CMI	Interpretação	Antibiótico	CMI	Interpretação
Benzilpenicilina			Moxifloxacina	0,12	S
Meropenem	<= 0,06	S	Resistência induzida a clindamicina	NEG.	-
Outra	<= 0,06	S	+Clantomicina		S
+Amoxicilina		S	Eritromicina	<= 0,12	S
Ampicilina		S	Clindamicina	<= 0,25	S
+Amoxicilina/Ácido clavulânico		S	Linezolid	<= 2	S
+Cefazolin		S	Tricoplanina	<= 0,12	S
+Cefazolid		S	Vancomicina	0,5	S
+Ceftriaxona		S	Tetraciclina	<= 0,25	S
+Cefuroxima		S	Tigeciclina	<= 0,06	S
Cefotaxima		S	Cloranfenicol	2	S
Cefepima		S	Rifampicina	<= 1,06	S
Daptomicina	<= 64	S	Trimetoprim/Sulfametoxazol	<= 15	S
Levofloxacina	0,5	I			
Versão do VITEK 2 Systems instalada: 3.03.3 Norma de Interpretação CMI: EUCAST 2021 Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES: EUCAST +EUCAST-based Norma de Interpretação Terapêutica: Cópia de EUCAST-based Último Padrinho AES Modificado: 19/Mai/2022 11:17 BST Página 1 de 3					