



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Bruna Alexandra Silva Moleano

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas orientada pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e pela Dra. Maria Beatriz Tomaz e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho de 2023





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Bruna Alexandra Silva Moleano

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas orientada pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e pela Dra. Maria Beatriz Tomaz e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Junho de 2023



“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.  
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

**Marie Curie**



## **AGRADECIMENTOS**

Pretendo agradecer a todas as pessoas que me acompanharam nesta jornada ajudando-me a crescer e a evoluir de todas as formas possíveis.

Agradeço à Dra. Maria Beatriz que me proporcionou esta oportunidade incrível de aprendizagem no laboratório de análises clínicas no LABETO e que sempre se mostrou disponível para responder a qualquer solicitação e à Professora Doutora Olga Cardoso pelo acompanhamento prestado na realização deste relatório.

Estou grata à Tânia Barbeiro que desde o primeiro dia me acolheu no posto de colheitas da Batalha e me ensinou o profissionalismo, empatia e rigor que uma técnica superior de diagnóstico e terapêutica deve possuir e desempenhar. Graças a ela desenvolvi um gosto enorme pelas colheitas de materiais biológicos. Agradeço também a todas as colegas do posto que sempre me motivaram e me apoiaram no desafio que é a realização de colheitas de produtos biológicos que era o que mais me ansiava.

Estou grata aos excelentes profissionais que tive a oportunidade de conhecer no laboratório e que desde o primeiro dia me receberam com muita paciência ensinando-me tudo o que necessitava e esclarecendo todas as minhas questões.

Agradeço às minhas amigas por todo o apoio prestado e ao meu companheiro por me incentivar sempre a alcançar os meus objetivos e a sonhar.

Por fim, e não menos importantes, agradeço aos meus pais e à minha irmã, que apesar de tantas dificuldades, nunca desistiram da minha educação e do meu crescimento pessoal e profissional. A eles, devo uma grande parte do meu percurso académico e da minha evolução pessoal. Obrigada à minha mãe por me ter dado asas para voar.

Vou de coração cheio com esta aprendizagem levando sempre comigo as pessoas que a marcaram.





## ÍNDICE

I.	Introdução .....	1
II.	Caracterização da Entidade de Estágio .....	1
III.	Fases dos exames laboratoriais.....	3
3.1.	Fase Pré-Analítica .....	3
3.2.	Fase Analítica.....	5
3.3.	Fase Pós-Analítica.....	6
IV.	Microbiologia .....	7
4.1.	Colorações.....	7
4.2.	Meios de cultura.....	8
4.3.	Produtos biológicos.....	11
4.3.1.	Urina.....	11
4.3.2.	Fezes.....	13
4.3.3.	Exsudados.....	16
a)	Pesquisa de Streptococcus do Grupo B.....	16
b)	Exsudado vaginal .....	16
c)	Exsudado uretral .....	17
d)	Exsudado orofaríngeo.....	18
e)	Exsudado ocular .....	18
f)	Exsudado auricular.....	18
g)	Exsudado purulentos (feridas e secreções).....	19
4.3.4.	Expetoração.....	19
4.3.5.	Exame micológico de faneras .....	19
4.3.6.	Identificação de microrganismos e antibiograma.....	20
4.3.7.	Espermograma.....	21
4.3.8.	CASO CLÍNICO BACTERIOLOGIA.....	21
V.	Hematologia.....	24
VI.	Bioquímica .....	26
6.1	Princípios de medição dos equipamentos.....	27
a)	Potenciometria.....	27
b)	Espectrofotometria.....	27
c)	Imunoturbidimetria.....	27
d)	Imunoensaio competitivo.....	28
e)	Quimioluminescência .....	28
f)	Imunoensaio fluoroenzimático.....	28
g)	Eletroforese das proteínas por capilaridade.....	29
6.2	Metabolismo dos Lípidos.....	29
a)	Colesterol total .....	29
b)	Colesterol-LDL .....	30
c)	Colesterol-HDL.....	30
d)	Triglicéridos.....	30

6.3	Metabolismo dos Hidratos de carbono.....	31
	a) Glicose .....	31
	b) HbA1c.....	32
	c) Insulina .....	32
6.4	Metabolismo das Proteínas.....	32
	a) Eletroforese das proteínas séricas .....	32
	b) Proteínas Totais .....	33
6.5	Metabolismo Mineral.....	33
	a) Cálcio .....	33
	b) Fosfato .....	34
	c) Magnésio.....	34
	d) Vitamina D.....	34
6.6	Avaliação Pancreática .....	35
	a) Lípase.....	35
	b) Amílase .....	35
6.7	Avaliação Renal .....	35
	a) Creatinina.....	36
	b) Ureia.....	36
	b) Ácido úrico.....	36
	c) Microalbuminúria.....	36
6.8	Avaliação Hepática.....	37
	a) Transaminases.....	37
	b) Bilirrubina.....	37
	c) Fosfatase Alcalina .....	37
	d) Gama-GT .....	38
6.9	Equilíbrio Hidro-eletrolítico .....	38
	a) Sódio.....	38
	b) Cloreto.....	38
	d) Potássio .....	38
6.10	CASO CLÍNICO BIOQUÍMICA.....	39
VII.	Imunologia / Endocrinologia.....	41
VIII.	Biologia Molecular .....	43
IX.	Conclusão .....	44
X.	Bibliografia .....	45

## ÍNDICE DE FÍGURAS

<b>Figura 1-</b> Frasco de urina com indicações para uma colheita correta e tubo para o qual a mesma é transferida para posterior análise nos aparelhos.....	4
<b>Figura 2-</b> Caracterização de Breathcard utilizada no teste respiratório de pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i> . Fonte: Bula de HELIPROBE® SYSTEM de Kibion.....	5
<b>Figura 3-</b> Aparelho SEDIMAX e UNAMAX e tira reagente obtida neste último.....	11
<b>Figura 4-</b> Sedimento urinário obtido no aparelho SEDIMAX de uma amostra de urina com cristais de oxalato de cálcio e cristais de ácido úrico.....	12
<b>Figura 5-</b> Exemplo de placa de Petri com sementeira de urina em meio ChromID™ CPS® Elite contendo colónias de <i>Escherichia coli</i> .....	13
<b>Figura 6-</b> Colónias incolores com precipitado negro em meio Hecktoen, suspeita de <i>Salmonella</i> sp.....	14
<b>Figura 7-</b> Kit utilizado para pesquisa de sangue oculto nas fezes. Fonte: Bula de Mini Parasep® SF Faecal Parasite Concentrator.....	15
<b>Figura 8-</b> À esquerda observação microscópica de ovos de <i>Enterobius vermicularis</i> e à direita de verme adulto deste parasita contendo os ovos no seu interior.....	15
<b>Figura 9-</b> Colónias suspeitas de <i>S. agalactiae</i> isoladas da zona vaginal e retal em Gelose CHROMID® Strepto B.....	15
<b>Figura 10-</b> Aglutinação à esquerda que indica presença de <i>S. agalactiae</i> .....	16
<b>Figura 11-</b> Observação microscópica de exsudado vaginal com predominância de bactérias de Gram negativo, alguns <i>Lactobacillus</i> sp. e clue cells sugestivo de vaginose bacteriana.....	16
<b>Figura 12-</b> Colónias azuladas que permitem a identificação direta de <i>C. albicans</i> em CAN...	17
<b>Figura 13-</b> Gelose de sangue com hemólise completa, sugestiva de colónias de <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> ou <i>S. agalactiae</i> .....	18
<b>Figura 14-</b> Observação ao microscópico de amostra de expetoração com coloração de Ziehl-Neelsen apresentando bacilos que coram de vermelho (BAAR sugestivo de micobactérias)...	19
<b>Figura 15-</b> Carta de identificação para bactérias de Gram negativo contendo poços com diferentes substratos.....	20
<b>Figura 16-</b> Exemplo de sistema de galeria para identificação de <i>Ureaplasma</i> sp.....	21
<b>Figura 17-</b> Placa com meio MSA incubada por 48 horas contendo crescimento de colónias de <i>S. aureus</i> que alteraram a coloração do meio de rosa para amarelo.....	22
<b>Figura 18-</b> Resultado positivo em teste de aglutinação de pesquisa de antígenos de <i>S. aureus</i> do Kit Pastorex Staph Plus.....	22

<b>Figura 19-</b> Placa com meio CPSE resultante da repicagem de 2 colónias: uma do meio MacConkey, sugestivo de <i>P. aeruginosa</i> , e outra do meio MSA identificadas como <i>S. aureus</i> ...	22
<b>Figura 20-</b> Esfregaço sanguíneo periférico corado com a coloração de May-Grünwald-Giemsa observando-se agregados plaquetárias responsáveis por uma pseudotrombocitopenia.....	24
<b>Figura 21-</b> Imagem de esfregaço sanguíneo obtida e selecionada pelo aparelho onde se visualizam neutrófilos, eosinófilos e basófilos.....	24
<b>Figura 22-</b> Cards utilizados para determinação de grupo sanguíneo do sistema ABO e sistema Rh para duas amostras verificando-se aglutinação na zona superior dos microtubos. Primeira amostra grupo sanguíneo A+ e segunda amostra grupo sanguíneo 0+.....	25
<b>Figura 23-</b> Padrão normal das proteínas séricas obtidas por eletroforese capilar. (22).....	29
<b>Figura 24-</b> Resultado positivo à esquerda de teste VDRL e negativo à direita.....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Tubos mais frequentemente utilizados para recolha de sangue, anticoagulante presente, uso pretendido e a amostra a ser utilizada para testes laboratoriais. (2).....	4
<b>Tabela 2-</b> Cartas de identificação e de antibiograma consoante o tipo de microrganismo isolado nos meios de cultura.....	20
<b>Tabela 3-</b> Antibiograma obtido pelo VITEK® 2 para as duas estirpes isoladas.....	22
<b>Tabela 4-</b> Aparelhos utilizados no sector de Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia, princípios de medição dos mesmos e analitos quantificados.....	26
<b>Tabela 5-</b> Dados laboratoriais obtidos do utente.....	39

## ABREVIATURAS

ACTH- Hormona adrenocorticotrófica  
ALT/GOT- Alanina aminotransferase  
AMH- Hormona Anti-Mulleriana  
ANA- Anticorpos anti-nucleares, citoplasmáticos e mitocondriais  
ANCA- Anticorpos anti-citoplasma dos granulócitos  
APTT- Tempo de tromboplastina parcial ativada  
ASMA- Anticorpo anti-músculo liso  
AST/GPT- Aspartato aminotransferase  
BAAR- Bacilo álcool-ácido resistente  
BHI- Brain-Heart Broth  
CAN- Gelose ChromID™ *Candida*  
CHCM- Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média  
CK- Creatina quinase  
COS- Gelose de Sangue  
DM- *Diabetes mellitus*  
DNA- Ácido desoxirribonucleico  
EDTA- Ácido etilendiaminotetracético  
EliA- Imunoensaio fluoroenzimático  
ENA- Antígenos extraíveis nucleares  
EPEC- *Escherichia coli* enteropatogénica  
EPI- Equipamento de proteção individual  
FSH- Hormona folículo-estimulante  
G6PD- Glicose-6-fosfato desidrogenase  
HAE- Gelose Chocolate *Haemophilus*  
Hb- Hemoglobina  
HbA1c- Hemoglobina glicada  
HbF- Hemoglobina Fetal  
hCG- Gonadotrofina coriônica humana  
HCM- Hemoglobina corpuscular média  
HDL- Lipoproteína de alta densidade  
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana  
ITU- Infecções do trato urinário  
Ig- Imunoglobulina

KESC- *Klebsiella, Enterobacter, Serratia e Citrobacter*  
LDH- Lactato desidrogenase  
LDL- Lipoproteína de baixa densidade  
LH- Hormona luteinizante  
MPV- Volume plaquetário médio  
MSA- Gelose Chapman  
NAD- Nicotinamida adenina dinucleótido  
PDW- Amplitude de variação do tamanho das plaquetas  
PTGO- Prova de Tolerância à Glicose Oral  
PTH- Hormona paratiroideia  
RDW- Amplitude de Distribuição de eritrócitos  
RNA- Ácido ribonucleico  
SALM- Gelose ChromID<sup>®</sup> *Salmonella* Elite  
STRB- Meio CHROMID<sup>®</sup> Strepto B  
T3- Triiodotironina  
T4- Tiroxina  
TDA- Triptofano Desaminase  
Tg- Tiroglobulina  
THC- Tetrahydrocannabinol  
TRAb- Anticorpos anti-recetor de TSH  
TRH- Hormona libertadora de tireotrofina  
TPO- Peroxidase tiroidiana  
TSH- Hormona estimulante da tiroide  
VCA- Gelose Chocolate + PolyViteX<sup>™</sup> VCAT  
VCM- Volume corpuscular médio  
VDRL- Venereal Disease Research Laboratory

## **RESUMO**

O presente relatório é referente ao estágio curricular realizado no laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho em Leiria. O estágio enquadra-se no plano de estudos do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, permite aplicar os conceitos adquiridos no mestrado e completa a minha formação nesta área de prevenção, diagnóstico e terapêutica de várias doenças.

Ao longo do meu percurso no Labeto efetuei colheitas de produtos biológicos no posto de colheitas da Batalha e desenvolvi várias competências e conhecimento no sector de Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Endocrinologia, Imunologia, Serologia Infeciosa, Autoimunidade e Biologia Molecular. Os conceitos adquiridos nas áreas de Microbiologia e Bioquímica são os mais evidenciados e pormenorizados neste relatório devido ao grande interesse que me despertam.

**Palavra-chave:** Análises Clínicas, Grupo Beatriz Godinho, Laboratório, Microbiologia, Bioquímica.

## **ABSTRACT**

This report refers to the curricular internship carried out at the laboratory Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., belonging to the Grupo Beatriz Godinho in Leiria. This internship is part of the study plan of the Master's degree in Clinical Analysis at the Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, which allowed me to apply the concepts acquired in it and completing my studies in this area, which is essential for the prevention, diagnosis and treatment of several diseases.

Throughout my journey at Labeto, I collected biological products at the Batalha collection point and developed various skills and knowledge in the sector of Microbiology, Hematology, Biochemistry, Endocrinology, Immunology, Infectious Serology, Autoimmunity and Molecular Biology. The concepts acquired in the areas of Microbiology and Biochemistry is the most highlighted and detailed in this report due to the interest they arouse in me.

**Keyword:** Clinical Analysis, Grupo Beatriz Godinho, Laboratory, Microbiology, Biochemistry.



## **I. INTRODUÇÃO**

As análises clínicas desempenham um papel crucial na prevenção, diagnóstico, terapêutica e monitorização de doenças permitindo avaliar a função de diversos órgãos, o estado metabólico e infeccioso. Com o intuito de aplicar os conceitos teóricos/práticos fornecidos no Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e de me transformar numa melhor técnica superior de diagnóstico e terapêutica realizei um estágio curricular com uma duração de seis meses no laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho em Leiria.

Ao longo do estágio contactei com a fase pré-analítica, que se inicia com a prescrição médica, e efetuei colheitas de diversos produtos biológicos no posto de colheitas da Batalha.

No Labeto efetuei ensaios analíticos nas diversas áreas como Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Endocrinologia, Imunologia, Serologia Infeciosa, Autoimunidade e Biologia Molecular.

Neste relatório abordarei várias temáticas essenciais do processo analítico como as fases que o mesmo inclui, o controlo de qualidade, os equipamentos manuseados e os ensaios analíticos e a sua relevância numa determinada patologia. Aprofundarei as áreas de análises clínicas que mais me fascinam e que considero de grande relevância para a saúde pública: Microbiologia e Bioquímica.

O término do meu estágio ocorreu após acompanhar a validação Biopatológica efetuada pelos especialistas do laboratório que me forneceram conhecimentos essenciais no âmbito de análises clínicas.

## **II. CARACTERIZAÇÃO DA ENTIDADE DE ESTÁGIO**

O laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas, S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho Saúde, foi fundado em 1974 nos Pousos em Leiria. Com a crescente confiança nos serviços prestados o laboratório transferiu-se, com novas instalações, para a cidade de Leiria (Avenida Marquês de Pombal) onde prosseguiu o diagnóstico laboratorial de excelência.

O grupo Beatriz Godinho dispõe de 3 laboratórios de análises clínicas (Leiria, Coimbra e Seia) e de mais de 160 postos de colheitas no centro do país possuindo como objetivo principal assegurar a fiabilidade e excelência dos serviços prestados no diagnóstico laboratorial pelo que a sua atividade é suportada pela utilização de controlos internos e corroborada pelo bom desempenho obtido nos seguintes programas de avaliação externa da qualidade: PNAEQ do INSA, Labquality, PSEC de AEFA y AEBM, SEQC, EUROIMMUN Quality Assurance, MBL Quality Control of Autoantibodies, BIO-DEV e RIQAS.

Desde 2003, o laboratório possui dupla certificação do Sistema de Gestão de Qualidade, de acordo com a norma NP EN ISO 9001 e as Normas para o Laboratório Clínico da Ordem dos Farmacêuticos, atribuída pela APCER.

Para além do Centro de Análises Bioquímicas o grupo da Beatriz Godinho Saúde possui várias empresas como três Clínicas Médicas e de Fisioterapia Polidiagnóstico (em Leiria, Marinheiros, Marinha Grande e Fátima), duas Clínicas de Imagiologia e Cardiologia (Clínica Luís Lourenço e Centro de Radiologia de Alcanena), Laboratório Tomaz e Farmácias.

A crescente evolução deste grupo deve-se aos seus impulsionadores, Dr. Amado Tomaz e Dra. Beatriz Godinho, e à segunda geração da família que integra a administração do mesmo.

### III. FASES DOS EXAMES LABORATORIAIS

A realização dos exames laboratoriais compõe-se em três fases: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. Com o intuito de obter resultados mais fidedignos e confiáveis possíveis todas as fases deverão ser sujeitas a rigorosos controlos de qualidade para deteção e prevenção de erros (1). O laboratório deverá reger-se por um manual de boas práticas assegurando resultados de qualidade no menor intervalo de tempo possível e com o menor custo associado.

#### 3.1. Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica inicia-se com a prescrição médica de uma análise clínica e conclui-se quando a amostra está preparada para ser analisada. A fase pré-analítica é a fase mais sujeita a erros verificando-se que a maioria dos erros do diagnóstico laboratorial são cometidos nesta fase (1) devido ao facto de existirem inúmeras variáveis, muitas das quais não conseguimos controlar pois dependem do próprio utente. Existem instruções de colheitas que os utentes deverão cumprir. O incumprimento das mesmas compromete a qualidade das amostras e, consequentemente, dos resultados.

Nos postos de colheitas os utentes tiram uma senha para serem atendidos à vez na receção. Na receção procede-se à introdução dos parâmetros a analisar no sistema informático perguntando aos utentes questões que auxiliam na interpretação dos resultados laboratoriais. As etiquetas, com códigos específicos para cada tubo e com a identificação dos utentes, são impressas e entregues ao técnico que realizará a colheita ou que identificará as amostras recolhidas pelo próprio utente.

O técnico encaminha o utente para a sala de colheitas e confirma a identidade do mesmo assim como os requisitos necessários para a realização da colheita, seguindo-se a preparação do material a utilizar.

Antes de efetuar a colheita os técnicos deverão utilizar os EPI e após a colheita todo o material utilizado contaminado com sangue ou secreções deverá ser descartado para um contentor de risco biológico específico.

#### Colheita de Fezes

Para se executar análises às fezes (exame coprológico e parasitológico) os utentes deverão colher amostras de fezes (do tamanho idêntico ao de uma noz) em dias consecutivos para um contentor estéril (exceção para pesquisa de *Giardia* sp. que deverá ser realizada em dias alternados). Nos exames parasitológicos as fezes poder-se-ão armazenar no frio por 3

dias. Para amostras de fezes para pesquisa de bactérias recomenda-se a entrega no laboratório no próprio dia para que a viabilidade das mesmas seja assegurada. Para realizar a pesquisa de sangue oculto nas fezes o utente deverá colher uma porção das fezes, com o coletor do kit fornecido no posto de colheitas, preenchendo as duas concavidades do mesmo com material fecal, em dias consecutivos e poderá refrigerar as mesmas no prazo máximo de 1 semana.

## Colheita de Sangue

Para efetuar colheitas de sangue utilizam-se vários sistemas: seringa e agulha ou vácuo. O sangue é colhido para os tubos com uma ordem correta: 1ª Tubo de citrato, 2º Tubo de Soro e 3º Tubo de EDTA.

**Tabela 1-** Tubos mais frequentemente utilizados para recolha de sangue, anticoagulante presente, uso pretendido e a amostra a ser utilizada para testes laboratoriais. (2)

Tubo utilizado	Anticoagulante	Uso pretendido	Amostra utilizada
Tampa Azul	Citrato de Sódio	Testes de Coagulação	Plasma
Tampa Vermelha	Sem anticoagulante (gel separador)	Química, Imunologia e Serologia	Soro
Tampa Lilás	EDTA	Hematologia	Sangue total

## Colheita de Urina

A amostra para análise sumária de urina deve ser a primeira urina da manhã ou, pelo menos, a última micção ter sido há mais de 2 horas.

Para a realização da urocultura o utente deverá proceder à correta higienização da zona íntima, desperdiçar o primeiro jato da manhã e colher a restante urina para um frasco estéril.

As urinas (análise sumária da urina e pesquisa de microalbuminúria) entregues nos postos de colheitas são transferidas para tubos corretamente identificados (Figura 1) para posterior análise nos equipamentos.

A análise de urina recolhida em 24 horas é entregue no posto de colheitas num recipiente, geralmente volumétrico, e regista-se o volume urinário transferindo-se posteriormente uma alíquota de urina para o tubo que irá para o laboratório.



**Figura 1-** Frasco de urina com indicações para uma colheita correta e tubo para o qual a mesma é transferida para posterior análise nos aparelhos.

## Colheita de Exsudados

No posto de colheitas da Batalha realizam-se colheitas de exsudados vaginais, oculares, faríngeos, entre outros. No meu estágio efetuei a colheita de exsudados vaginais para pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em grávidas recolhendo o exsudado com uma zaragatoa, na zona vaginal e na zona retal (1/3 externo da vagina e zona ano rectal). As zaragatoas são colocadas no meio de transporte para posterior envio ao laboratório. Para esta colheita, a utente não deve realizar a higiene matinal, não deve estar a tomar/aplicar antibióticos ou pomadas locais e não deve ter relações sexuais antes da colheita.

## Colheita para pesquisa de *Helicobacter pylori*

Ao longo do meu estágio observei a colheita do teste respiratório para pesquisa de *Helicobacter pylori*. O utente deverá estar em jejum de pelo menos 6 horas. Para a realização do teste o utente ingere uma cápsula de ureia e após dez minutos sopra suavemente para a abertura do Breathcard (Figura 2) até o indicador do mesmo mudar de “cor-de-laranja” para amarelo. De seguida o Breathcard, devidamente identificado, é inserido num envelope que será entregue ao laboratório.



**Figura 2-** Caracterização de Breathcard utilizada no teste respiratório de pesquisa de *Helicobacter pylori*.  
Fonte: Bula de HELIPROBE® SYSTEM de Kibion.

No laboratório procede-se à triagem das amostras nos setores correspondentes. Sempre que as amostras não possuam qualidade/identificação terão de ser rejeitadas.

### 3.2. Fase Analítica

A fase analítica é constituída por vários processos como a manutenção e preparação dos equipamentos, controlo de qualidade, realização das análises dos produtos biológicos e o registo dos resultados obtidos.

Previamente à realização das análises nos equipamentos efetua-se o controlo de qualidade interno nos mesmos. Este controlo consiste no ensaio analítico de amostras de controlo com valores conhecidos permitindo avaliar a precisão e desempenho dos procedimentos analíticos. Os resultados obtidos pelo controlo de qualidade interno são interpretados pelas Regras de Westgard, por exemplo, permitindo aceitar a corrida analítica ou auxiliando na descoberta da causa de um problema.

Após a verificação dos controlos de qualidade internos nos vários equipamentos inicia-se o trabalho diário com as análises dos produtos biológicos respetivos. No Labeto a grande maioria das análises são automatizadas e o sector de microbiologia é a valência analítica onde se efetuam mais ensaios manuais.

○ Labeto participa em vários programas de avaliação externa da qualidade.

### **3.3. Fase Pós-Analítica**

A fase pós-analítica corresponde à validação biopatológica dos resultados obtidos e à entrega do boletim de resultados ao respetivo destinatário.

A validação biopatológica consiste na análise detalhada do boletim de resultados. Verifica-se a identidade, a idade e o sexo do utente, a coerência dos resultados obtidos com as diferentes análises realizadas, com o historial clínico, com as patologias documentadas, com a medicação referida, entre outros parâmetros.

No caso de valores críticos, disponibilizados em tabelas no Labeto, os médicos e/ou os utentes são contactados, dependendo das situações clínicas.

Após a análise criteriosa do boletim de resultados o mesmo é enviado ao utente.

## IV. MICROBIOLOGIA

Selecionei o sector de microbiologia para aprofundar no meu estágio pois é a área que sempre me fascinou e cativou mais. É uma área em constante evolução e, como é pouco automatizada, necessita de muita dedicação e concentração por parte dos técnicos.

Na sala de microbiologia existem os equipamentos necessários à execução de análises para pesquisa de microrganismos como estufas, frigoríficos, microscópios óticos, câmara de fluxo laminar, entre outros. A este sector são entregues para análise amostras biológicas como urina, fezes, unhas, exsudados, expetorações, entre outros.

Com o objetivo de pesquisar quais os agentes etiológicos responsáveis pelas infeções, as amostras deverão ser corretamente colhidas, conservadas e transportadas. Efetua-se o isolamento de bactérias e/ou fungos patogénicos, realiza-se a sua identificação e, no caso de infeções bacterianas, a sensibilidade a antibióticos. No caso de suspeita de parasitas observam-se as amostras ao microscópio ótico identificando o género e/ou espécie responsável pela infeção.

### 4.1. Colorações

Em microbiologia recorre-se a várias colorações com o intuito de auxiliar na identificação dos agentes etiológicos da infeção. As colorações são automatizadas pelo aparelho Mirastainer® System (Merck).

A preparação a fresco com KOH é utilizada para pesquisa de fungos (exame micológico direto).

**Coloração de Gram:** A coloração de Gram é a coloração mais utilizada e permite diferenciar bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo devido a diferentes estruturas da parede celular. As bactérias de Gram-positivo coram de roxo devido à espessa camada de peptidoglicano e ao solvente que desidrata a parede celular contraindo os poros do peptidoglicano promovendo a retenção do corante cristal violeta. Como as bactérias de Gram-negativo apresentam uma membrana externa e uma camada de peptidoglicano mais fina não retêm tanto corante aquando das descolorações com o solvente (desintegra a membrana externa e dilata os poros na parede) apresentando assim a coloração do corante adicionado posteriormente (fucsina), cor rosa (3). A observação microscópica de lâminas coradas com esta coloração é útil para a visualização da forma morfológica das bactérias (cocos, bacilos, cocobacilos e entre outras) auxiliando na identificação bacteriana.

**Coloração de Ziehl-Neelsen:** A coloração de Ziehl-Neelsen é utilizada para corar bacilos ácido-álcool-resistentes, ou seja, bactérias que resistem fortemente à descoloração devido à presença de ácidos micólicos, como por exemplo *Mycobacterium* sp. As células são coradas com Fucsina fenicada e apresentam uma coloração vermelha, no entanto, após descoloração só os BAAR preservam esta coloração. Recorre-se ao azul de metileno para corar de azul as restantes estruturas celulares contrastando com a coloração vermelha dos BAAR (4).

## 4.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados no sector de microbiologia são essenciais para permitir o isolamento e crescimento de determinados microrganismos.

Recorre-se a meios de enriquecimento não seletivos para estimular o crescimento da maioria dos microrganismos, a meios de isolamento seletivos, que permitem a recuperação de organismos específicos inibindo o crescimento de outros e a meios de isolamento eletivos que favorecem o crescimento de microrganismos específicos (4). A BioMérieux é a empresa que fornece a maioria dos meios utilizados no Labeto.

**Gelose ChromID™ CPS® Elite:** Meio utilizado nas uroculturas que permite o isolamento, contagem e identificação direta ou presuntiva de bactérias. A identificação é conseguida através da presença de substratos cromogénicos na gelose que face às enzimas bacterianas presentes produzem um produto cromogéneo que confere coloração às colónias. Permite a identificação: direta de *Escherichia coli* produtoras de  $\beta$ -glucuronidase e/ou  $\beta$ -galactosidase através do crescimento de colónias num tom vermelho a carmim; a identificação presuntiva de *Enterococcus* através do crescimento de colónias num tom turquesa em estirpes produtoras de  $\beta$ -glucosidase; a identificação presuntiva de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* em colónicas com um tom azul a verde de estirpes produtoras de  $\beta$ -glucosidase; a identificação presuntiva de *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* sp. através do crescimento de colónias com coloração num tom castanho de estirpes produtoras de desaminase.

**Gelose Sangue (COS):** Gelose Columbia mais 5% de sangue de carneiro muito nutritiva que permite o crescimento e isolamento de bactérias exigentes assim como deteção de hemólise. As bactérias produtoras de  $\alpha$  hemólise (hemólise incompleta) apresentam coloração esverdeada ao redor da colónica (Ex: *Streptococcus pneumoniae*) e produtoras de  $\beta$  hemólise (hemólise completa) apresentam uma zona clara ao redor ou por baixo das colónias (Ex: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*).



**BHI e Nutriente agar:** Meios nutritivos utilizados para cultura de vários microrganismos não fastidiosos.

**Agar entérico de Hektoen:** É um meio seletivo para isolamento e diferenciação de patogênicos da família *Enterobacteriaceae* nas fezes e outros produtos biológicos, especialmente *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. É constituído por sais biliares que inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo (meio seletivo), por indicador de pH (fucsina ácida e azul de bromotimol), por compostos de carbono (lactose, sacarose e salicina) e citrato de amónia férrico e tiosulfato de sódio. As bactérias não fermentadoras destes hidratos de carbono não provocam a alteração da cor do sistema de pH ao contrário das bactérias que fermentam pelo menos um destes carboidratos alterando a coloração do meio de amarelo para cor-de-laranja/salmão. Bactérias que possuem a tiosulfatase reductase convertem o tiosulfato de sódio em H<sub>2</sub>S que ao reduzir o citrato de amónia férrico produz um precipitado preto. Deste modo, colónias de *Escherichia coli* apresentam uma coloração salmão e as colónias de *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. apresentam-se incolores sendo que esta última se diferencia pela formação de um precipitado negro.

**Gelose ChromID® Salmonella Elite (SALM):** Meio cromogénico para isolamento seletivo e identificação de *Salmonella* sp. através do crescimento de colónias com coloração malva.

**Gelose MacConkey:** Meio seletivo que permite o isolamento de enterobactérias através da presença de cristal violeta e sais biliares que inibem crescimento de bactérias de Gram positivo, do indicador de pH (vermelho neutro) e da lactose. A fermentação deste hidrato de carbono confere a coloração vermelha às colónias (Ex: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp.) e as bactérias que não o fermentam permanecem incolores (Ex: *Salmonella* sp. e *Shigella* sp.).

**Gelose Chapman (MSA):** Gelose destinada ao isolamento de estafilococos e deteção de *Staphylococcus aureus*. Devido ao seu elevado teor em cloreto de sódio é um meio seletivo pois limita o desenvolvimento de bactérias que não sejam estafilococos. Ao contrário da grande maioria das bactérias, os estafilococos apresentam a capacidade de crescerem neste meio pois são halotolerantes. A presença de manitol na gelose permite a deteção de *Staphylococcus aureus* que ao fermentar este açúcar produz colónias amarelas (das bactérias estudadas só o *S. aureus* fermenta o manitol).

**Gelose Chocolate + PolyViteX™ VCAT (VCA):** Gelose seletiva que permite o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* através da base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina), fornecido pela hemoglobina, e V (NAD) e pelo

PolyViteX™. A seletividade é conseguida com recurso a antibióticos e a antifúngicos que inibem a maioria das restantes bactérias e leveduras. Este meio é incubado em atmosfera apropriada com CO<sub>2</sub> (crescimento capnófilico).

**Gelose Chocolate *Haemophilus* (HAE):** Meio seletivo para *Haemophilus* sp. inibindo o crescimento de bactérias de Gram positivo e de leveduras devido à associação de antibióticos e antifúngicos. O crescimento de *Haemophilus* sp. é obtido devido à base nutritiva rica em fatores X (hemina) e V (NAD). O crescimento de *Haemophilus* sp. exige a presença destes fatores (ex: *H. influenzae* necessita dos dois fatores para crescer neste meio enquanto o *H. ducreyi* necessita apenas do fator X). Este meio é incubado em atmosfera apropriada com CO<sub>2</sub> (crescimento capnófilico).

**Gelose ChromID™ *Candida* (CAN):** Meio cromogéneo que permite o isolamento seletivo de leveduras e identificação direta de *Candida albicans* com colónias azuladas.

**Meio Sabouraud Gentamicina e Cloranfenicol:** Meio seletivo para cultura de leveduras e fungos filamentosos. A presença de gentamicina inibe o crescimento de bactérias. Para evitar a multiplicação de bactérias resistentes a este antibiótico (Ex: *Streptococcus* sp. e *Proteus* sp.) recorre-se a cloranfenicol, melhorando assim a seletividade do meio.

**Meio Sabouraud Actidiona e Cloranfenicol:** Meio seletivo recomendado para a cultura de algumas espécies de fungos filamentosos, principalmente dermatófitos. Cloranfenicol inibe a proliferação bacteriana e a actidiona inibe algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras.

**Meio Sabouraud Líquido:** Permite a cultura ou a repicagem de leveduras e bolores rico em peptonas e glucose.

**Meio Sabouraud Simples (Sabouraud Dextrox Agar):** Meio para cultura, isolamento e identificação de leveduras e bolores.

**Caldo Todd-Hewitt + Antibióticos:** Caldo de enriquecimento seletivo para estreptococos do grupo B. A seletividade é conseguida com o recurso a antibióticos que inibem a maioria das bactérias de Gram-negativo.

**Caldo Tetrionato:** Meio líquido de enriquecimento seletivo para *Salmonella* sp. Possui sais biliares que inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo e tetrionato que permite a multiplicação das bactérias que reduzem este composto (Ex: *Salmonella* sp. e *Proteus* sp.) em detrimento das restantes. O isolamento de *Salmonella* sp. é conseguido recorrendo-se a novobiocina que inibe o desenvolvimento de *Proteus* sp.

**Meio CHROMID® Strepto B (STRB):** Meio cromogénico seletivo para rastreio de estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) em mulheres grávidas que contém na sua composição peptonas, antibióticos e substratos cromogénicos que alteram a coloração das colónias desta espécie para rosa pálido a vermelho.

**Gelose Granada™:** Meio cromogénico seletivo para identificação de estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) através da alteração da coloração das respetivas colónias para um pigmento laranja a vermelho.

**Meio Lowenstein-Jensen:** Meio seletivo para crescimento e isolamento de micobactérias apresentando colónias com formato característico.

**Meio Extrato de Malte:** Meio de cultura para leveduras e fungos filamentosos favorecendo a esporulação dos mesmos.

### 4.3. Produtos biológicos

#### 4.3.1. Urina

A urina, produto líquido e estéril, é secretada pelos rins, armazenada na bexiga e excretada pela uretra. A urina é constituída, na sua grande maioria, por água e apresenta na sua composição metabolitos azotados tóxicos. É produzida após filtração renal, reabsorção e secreção.

A análise da urina permite auxiliar no diagnóstico de ITU, doenças renais, monitorização de DM e entre outras patologias.

#### a) Análise sumária da urina (Urina tipo II)

A análise sumária da urina engloba dois tipos de determinações: análise semi-quantitativa de alguns parâmetros químicos da urina (cor, acetona, esterase leucocitária, proteínas, urobilinogénio, pH, nitritos, glicose, corpos cetónicos, ácido ascórbico, densidade e sangue) e o sedimento urinário (estimativa semi-quantitativa de número de elementos figurados como eritrócitos, leucócitos, células de descamação, entre outros) (8).

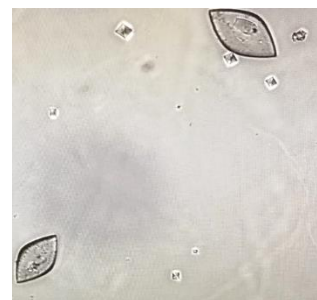


**Figura 3-** Aparato SEDIMAX e UNAMAX e tira reagente obtida neste último.

A análise dos parâmetros bioquímicos é realizada pelo aparelho UNAMAX recorrendo à utilização de tiras reagentes e colorimetria. Nas ITU é frequente o aparecimento de eritrócitos, leucócitos e nitritos.

O sedimento urinário é realizado pelo aparelho SEDIMAX que possui um microscópico no seu interior que projeta as imagens capturadas num computador onde serão alvo de posterior análise por parte do técnico superior. Os dois aparelhos estão acoplados para permitir uma maior produtividade do processo (Figura 3). O SEDIMAX projeta as imagens no computador assim como a contagem de leucócitos, eritrócitos, cristais, leveduras, entre outros (Figura 4).

Após a obtenção dos resultados por estes aparelhos realiza-se a validação das urinas verificando se a informação obtida pelo UNAMAX e SEDIMAX é coerente. Se existir informação pouco coerente realiza-se a confirmação da análise manualmente nas tiras testes e/ou no microscópico ótico.



**Figura 4-** Sedimento urinário obtido pelo aparelho SEDIMAX de uma amostra de urina com cristais de oxalato de cálcio e cristais de ácido úrico.

## **b) Urocultura**

As ITU são das infeções mais comuns o que resulta numa maior procura de diagnóstico e de tratamento nas unidades de saúde. A urina presente na bexiga é estéril porém quando a mesma apresenta colonização de microrganismos patógenos estamos perante uma ITU (5). Os microrganismos podem colonizar qualquer nível do aparelho urinário, desde a uretra (uretrite), bexiga (cistite), ureteres (ureterites) ao parênquima renal (pielonefrite).

As ITU encontram-se em todos os grupos etários no entanto, apresentam maior incidência em mulheres devido a alguns fatores intrínsecos como a distância mais curta entre a uretra e o ânus (predispõe a colonização da vagina e da uretra por patógenos da flora intestinal), uretra mais curta e o período pós-menopausa, que devido à diminuição do estrogénio e dos lactobacilos vaginais as mulheres apresentam maior suscetibilidade para a ocorrência destas infeções (6).

Os microrganismos, mais frequentes, responsáveis pelas ITU são bactérias provenientes da microbiota intestinal, sendo a *Escherichia coli* responsável por 70% a 90% dos casos, seguida do *Staphylococcus saprophyticus* (em 10% a 20% dos casos). Outras bactérias patogénicas que também colonizam o aparelho urinário são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* dos grupos B e D, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp (7) e entre outras.

Devido à resistência crescente aos antibióticos, tanto no meio hospitalar como na comunidade, é de extrema importância o diagnóstico do agente infeccioso e o conhecimento do antibiograma.

A urocultura permite a quantificação e identificação da bactéria responsável pela ITU.

As urinas são semeadas em placas, com as devidas identificações, com meio ChromID™ CPS® Elite com a utilização de ansas com volume de 10 µl. Com a ansa, contendo o inóculo, efetua-se uma estria na vertical e semeia-se a amostra desenhando-se estrias horizontais apertadas até ao fim da caixa (Figura 5).



**Figura 5-** Exemplo de placa de petri com sementeira de urina em meio ChromID™ CPS® Elite contendo colónias de *Escherichia coli*.

As placas semeadas são incubadas a 37°C por 16-24 horas e verifica-se a presença ou não de crescimento bacteriano. A presença de 10<sup>3</sup> e/ou 10<sup>4</sup> organismos no meio indicam uma provável contaminação e um número superior a 10<sup>5</sup> indica uma infeção provável. Colónias de tom vermelho permitem a identificação direta de *Escherichia coli*. Colónias suspeitas de estreptococos do grupo B em mulheres grávidas são repicadas para meio Granada permitindo a identificação direta destes cocos. Nas colónias castanhas suspeitas de *Proteus mirabilis* realiza-se o teste do indol (indol negativo) e do TDA (TDA positivo) permitindo a identificação desta espécie. A coloração de Gram é efetuada em casos de dúvidas e de presença de leucócitos e/ou eritrócitos superiores a 15 para excluir infeção por bactérias que não apresentam capacidade de crescimento no meio utilizado. Também se realiza a coloração de Ziehl-Neelsen quando no sedimento urinário se excede os 30 eritrócitos e/ou 30 leucócitos, com ausência de crescimento, para excluir possível tuberculose renal.

A identificação quando necessária, e o antibiograma das bactérias isoladas, é realizada no aparelho VITEK® 2.

#### 4.3.2. Fezes

##### a) Pesquisa de sangue oculto

A presença de sangue nas fezes pode ser devida a úlceras, colite, neoplasias e outras causas.

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é importante para o rastreio do cancro colorretal pois permite a redução da mortalidade associada ao mesmo (9).

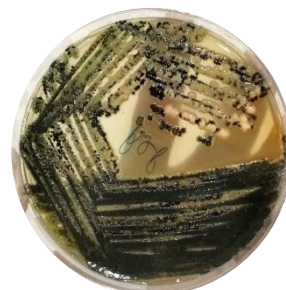
Esta análise é realizada pelo aparelho HM-JACK que recorre a partículas de látex revestidas com anticorpos policlonais para a hemoglobina humana. Através da aglutinação do

reagente com a hemoglobina presente nas fezes o aparelho quantifica a concentração de hemoglobina fecal por turbidimetria.

## b) Coprocultura

As infecções intestinais bacterianas são comuns e podem ser graves e fatais devido à diarreia que promove a perda de fluidos e eletrólitos do organismo. A diarreia de origem bacteriana ocorre devido à capacidade das bactérias produzirem toxinas que danificam o epitélio intestinal, que provoca um desequilíbrio de absorção e de secreção de íons e solutos, promovendo a entrada de água para o intestino de modo a restabelecer a concentração iônica normal (10). Deste modo, a identificação do agente patogénico responsável pela infeção pode ser essencial para instituir a terapêutica (se necessária).

A coprocultura consiste na cultura de fezes em meios específicos com o objetivo de se identificar o agente patogénico bacteriano responsável pela infeção realizando-se a pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli* e *Shigella* sp. Com o intuito de se proceder à cultura das fezes é efetuada uma suspensão das mesmas em soro fisiológico que se semeia em meio Hektoen, pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície de um meio sólido (Figura 6) e em caldo de enriquecimento Tetrionato (após 24 horas é semeado no meio Hektoen e no meio SALM). Se as fezes forem diarreicas também se realiza a sementeira em meio MSA, para pesquisa de *S. aureus*, e em CAN, pesquisa de leveduras. Se forem de utentes com idade inferior a 2 anos, semeia-se também em MacConkey e posteriormente repica-se as colónias suspeitas para nutriente agar e são efetuados testes de aglutinação para pesquisa de EPEC. Realiza-se o esfregaço da suspensão de fezes numa lâmina para ser sujeita à coloração de Gram.



**Figura 6-** Colónias incolores e com precipitado negro em meio Hecktoen suspeitas de *Salmonella* sp.

Bactérias que alteram a coloração do meio Hektoen para salmão podem indicar presença de *Escherichia coli* e as que não promovem esta alteração poderão corresponder a *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. Colónias incolores com precipitado negro em Hecktoen são sugestivas de *Salmonella* sp. assim como colónias malva em meio SALM.

As colónias suspeitas, tanto de *Shigella* sp. como *Salmonella* sp., são repicadas para nutriente agar e sujeitas a testes de aglutinação. As identificações obtidas nos testes de aglutinação são confirmadas no equipamento VITEK® 2, no qual também se efetuam os antibiogramas.

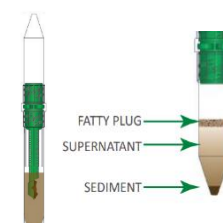
Procede-se à pesquisa de *Campylobacter* sp. através de um kit rápido de imunocromatográfico (lateral flow assay) da RIDA®QUICK.

### c) Exames parasitológicos

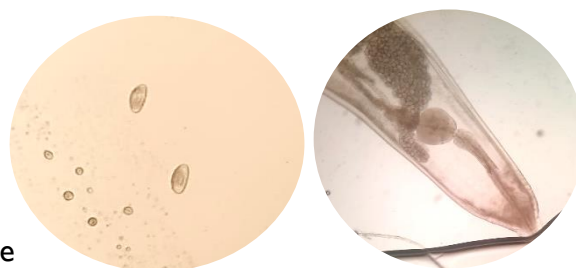
As infecções intestinais provocadas por helmintas e protozoários estão entre as parasitoses mais prevalentes em países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, a maioria das infecções parasitárias são provocadas por protozoários (11).

O agente patogénico responsável pela parasitose é identificado através da análise macroscópica das fezes, para pesquisa de larvas e outras estruturas parasitárias, e de observação microscópica de larvas e ovos de helmintas e de quistos e ooquistos de protozoários. Um kit de concentração é utilizado para a preparação das fezes com vista à observação microscópica. Com a colher do kit (Figura 7) recolhe-se uma porção de fezes e insere-se no Mini Parasep com fixador e agita-se no vórtex para emulsionar. Realiza-se a centrifugação do Mini Parasep invertido e como possui um filtro (impede a passagem de partículas de maior tamanho isolando os parasitas e componentes de menores dimensões) forma-se um sedimento no cone de sedimentação que permite a observação microscópica de parasitas. Decanta-se o líquido sobrenadante e pipeta-se uma gota do sedimento numa lâmina para ser alvo de observação ao microscópico ótico com a objetiva de 10x (visualizar ovos) e depois com 40x (visualizar quistos).

Os parasitas presentes nas fezes que são encontrados com maior frequência, após observação microscópica, no Labeto são *Enterobius vermiculares* (Figura 8), quistos de *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* e de *Giardia lamblia*.



**Figura 7-** Kit utilizado para pesquisa de parasitas nas fezes. Fonte: Bula de Mini Parasep® SF Faecal Parasite Concentrator.



**Figura 8-** À esquerda observação microscópica de ovos de *Enterobius vermicularis* e à direita de verme adulto deste parasita contendo os ovos no seu interior.

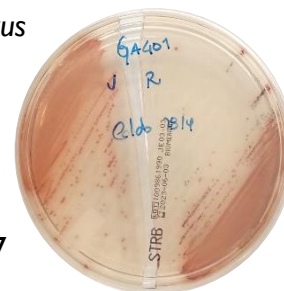
### 4.3.3. Exsudados

#### a) Pesquisa de *Streptococcus* do Grupo B

A bactéria *Streptococcus agalactiae*, também designada *Streptococcus* do grupo B, é a causa mais comum de infecção bacteriana neonatal (12) e pode provocar meningite neonatal e ser fatal (13).

Como prevenção desta infecção está recomendado o rastreamento da colonização desta bactéria na zona vaginal e retal entre as 35 e as 37 semanas de gravidez para ser possível iniciar a terapêutica antes do parto.

Inocula-se as zaragatoas, da zona vaginal e retal, em caldo Todd Hewitt que irá a incubar na estufa a 37°C e depois será semeado em Gelose STRB. Colônias com coloração rosa pálido/vermelho suspeitas de *S. agalactiae* (Figura 9) são confirmadas por teste de aglutinação da PASTOREX™ STREP da BIO-RAD (Figura 10) uma vez que o antígeno das colônias extraído é identificado utilizando partículas em látex revestidas com anticorpos homólogos específicos do grupo.



**Figura 9-** Colônias suspeitas de *S. agalactiae* isoladas da zona vaginal e retal em Gelose CHROMID® Strepto B.

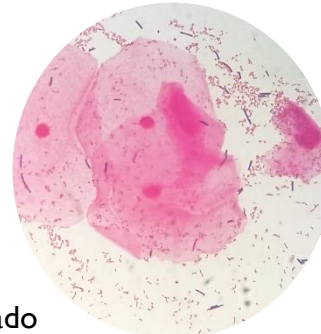


**Figura 10-** Aglutinação à esquerda que indica presença de *S. agalactiae*.

#### b) Exsudado vaginal

A microbiota vaginal (conjunto de microrganismos que coabitam num determinado local) é composta, na sua grande maioria, por *Lactobacillus* sp. (bacilos de Gram-positivo) e desempenha um papel essencial para a prevenção de infecções urogenitais. Deste modo, um desequilíbrio da microbiota vaginal promove uma maior suscetibilidade de colonização por organismos patogênicos responsáveis por infecções fúngicas, infecções do trato urinário, vaginose bacteriana e infecções sexualmente transmissíveis (14).

Vários agentes patogênicos podem ser responsáveis por vaginose bacteriana e verifica-se uma diminuição do número de *Lactobacillus* sp. e um aumento de *Gardnerella vaginalis* e de outras bactérias (Figura 6). A vaginose bacteriana é caracterizada por um corrimento vaginal abundante, aquoso e esbranquiçado acompanhado de um odor forte (“peixe podre”), intensificado com o teste de KOH, e se não tratada corretamente pode evoluir para doença inflamatória pélvica que aumenta o risco de esterilidade (13).



**Figura 11-** Observação microscópica de exsudado vaginal com predominância de bactérias de Gram negativo, alguns *Lactobacillus* sp. e clue cells sugestivo de vaginose bacteriana.



A infecção fúngica mais frequente na zona genital é a candidíase. A candidíase é provocada por uma levedura que coloniza a vagina, *Candida albicans* é a mais comum, e é caracterizada por prurido intenso, ardor na zona genital e corrimento esbranquiçado espesso (13).

A análise do exsudado vaginal permite auxiliar na identificação destas infeções assim como de doenças sexualmente transmissíveis provocadas por *Trichomonas vaginalis* e *N. gonorrhoeae*. Para a realização deste exsudado introduz-se 2 zaragatoas, uma seca, com gotas de soro, e outra que será transportada em meio com carvão, até ao colo do útero com o auxílio de um espéculo.

Com a zaragatoa seca, realiza-se a medição do pH e a coloração de Gram e de Azul de Metileno.

A pesquisa do trofozoíto do parasita *Trichomonas vaginalis* é efetuada através de um exame a fresco com soro fisiológico previamente aquecido a 37°C recorrendo-se à zaragatoa seca armazenada na estufa. O parasita vivo é observado ao microscópico ótico visualizando-se a sua mobilidade típica.

A sementeira efetua-se com a zaragatoa em meio de transporte com carvão em COS, CAN e em VCA. A presença de uma colónia dominante em COS pode indicar infeção e desequilíbrio da microbiota e deverá ser identificada.

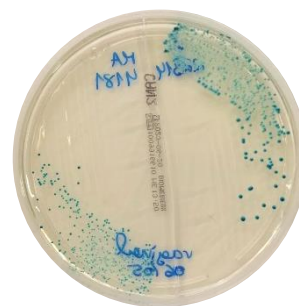
Crescimento fúngico em CAN pode permitir a identificação direta de *Candida albicans* (Figura 12) ou a identificação da espécie do género *Candida* pelo aparelho VITEK® 2.

Colónias presentes em gelose VCA poderão ser indicativas de *Neisseria* sp., assim como diplococos de Gram negativo visualizados na coloração de Gram, e deverão ser identificadas no VITEK® 2.

Se a utente for uma mulher grávida realiza-se o enriquecimento em caldo Todd e sementeira em Gelose STRB para pesquisa de *S. agalactiae*. Os meios e caldos são incubados de acordo com as respetivas bulas.

### c) Exsudado uretral

O exsudado uretral permite identificar bactérias causadoras de infeções e é realizado maioritariamente no género masculino através da introdução de 2 zaragatoas na uretra, uma seca e outra que será transportada em meio com carvão.



**Figura 12-** Colónias azuladas que permitem a identificação direta de *C. albicans* em CAN.

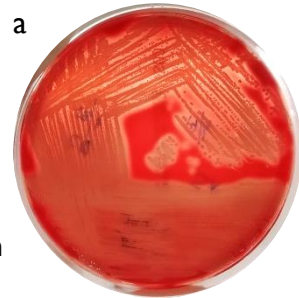
Com a zaragatoa seca, com gotas de soro, realiza-se a coloração de Gram e de Azul de Metileno e o exame direto (a fresco) para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*.

Com a zaragatoa em meio de transporte com carvão procede-se à sementeira em COS, MSA, CAN, MacConkey, VCA e no caso de o utente ser do género masculino em gelose de chocolate para pesquisa de *Haemophilus* sp.. De seguida, meios são incubados e colónias suspeitas são identificadas.

#### d) Exsudado orofaríngeo

A orofaringe é colonizada por diversos microrganismos e as faringites são das infeções do trato respiratório superior mais frequentes sendo a sua causa bacteriana mais comum o *Streptococcus* beta-hemolítico do Grupo A (3).

Para pesquisa do agente etiológico da infeção efetua-se a coloração de Gram e sementeira em COS, MSA, CAN e em caldo Todd com uma zaragatoa introduzida na orofaringe e amígdalas. Se em COS (Figura 13) crescer alguma colónia dominante a mesma deverá ser identificada para determinar a etiologia da infeção, assim como colónias suspeitas nos restantes meios. O meio COS auxilia a identificação do microrganismo presente através da ausência ou presença de hemólise (hemólise incompleta ou completa).



**Figura 13-** Gelose de sangue com hemólise completa sendo sugestiva de colónias de *S. aureus*, *S. pyogenes* ou *S. agalactiae*.

A pesquisa de *Streptococcus* do Grupo A também pode ser efetuada através de um teste rápido imunocromatográfico (“lateral flow assay”) da Biosynex.

#### e) Exsudado ocular

Uma diversidade de microrganismos podem ser responsáveis por infeções oculares entre eles o género *Neisseria*, *Haemophilus*, *S. aureus*, entre outras.

Nestes exsudados procede-se à coloração de Gram e à sementeira em COS, MSA, CAN, MacConkey, HAE e em BHI. Se se tratar de um recém-nascido também se semeia em VCA para pesquisa de *Neisseria* sp.

#### f) Exsudado auricular

O exsudado auricular permite a identificação do agente etiológico de várias infeções auriculares, como a otite que é provocada, na grande maioria das vezes, por *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (3).

Realiza-se a coloração de Gram e a sementeira em COS, MSA, CAN, MacConkey, HAE e em Sabouraud simples. Colónias suspeitas deverão ser identificadas.

#### **g) Exsudado purulentos (feridas e secreções)**

Nos exsudados purulentos, como feridas, é frequente isolar-se *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

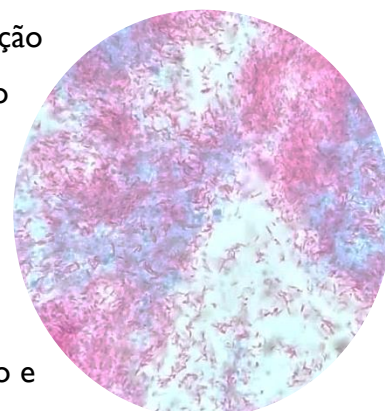
A coloração de Gram é efetuada, com a zaragatoa inoculada na zona da ferida, limpa com soro, assim como a sementeira em COS, MSA, CAN e MacConkey. Colónias suspeitas deverão ser identificadas.

#### **4.3.4. Expetoração**

A expetoração permite identificar o agente patogénico responsável por infeções do trato respiratório inferior. As bactérias que se associam mais a este tipo de infeções são o *Mycoplasma pneumoniae*, *S. pneumonia* e *H. influenzae*. Embora seja menos frequente a *Mycobacterium tuberculosis*, agente responsável pela tuberculose, também poderá ser identificada.

Na câmara de fluxo laminar realiza-se a sementeira em COS, MSA, CAN, MacConkey, HAE e Sabouraud simples e esfregaços em lâminas para coloração de Gram, avaliar a flora microbiana, e de Ziehl-Neelsen (direto e após concentração), para pesquisa de *Mycobacterium* sp. (Figura 14). Colónias suspeitas presentes nos meios deverão ser identificadas.

Se for requisitado o exame cultural de micobactérias procede-se à descontaminação e concentração da expetoração e posterior sementeira em meio Lowenstein-Jensen incubando-se até 60 dias. Quando se verifica crescimento sugestivo de micobactérias (aspeto de “couve-flor”) a cultura é enviada para um laboratório de referência que procederá à sua identificação e antibiograma.



**Figura 14-** Observação ao microscópico de amostra de expetoração com coloração de Ziehl-Neelsen apresentando bacilos que coram de vermelho (BAAR sugestivo de micobactérias).

#### **4.3.5. Exame micológicos de faneras**

O Labeto realiza pesquisa de fungos não leveduriformes e leveduriformes com maior frequência nas unhas e no cabelo mas também noutros locais como na pele. Procede-se à realização de uma lâmina com as faneras com KOH para exame microscópico direto e

sementeira em meio Sabouraud Gentamicina/Cloranfenicol, em Sabouraud Actidiona/Cloranfenicol e em Sabouraud Simples que ficam a incubar até 30 dias.

Os fungos filamentosos que cresçam nestes meios são repicados para o meio Extrato de Malte. A identificação dos fungos filamentosos é efetuada pelas suas colónias ou pela observação microscópica da sua morfologia.

Os fungos leveduriformes são repicados para meio CAN e, se necessário, identificados no aparelho VITEK® 2.

#### 4.3.6. Identificação de microrganismos e antibiograma

A maioria das bactérias e leveduras isoladas são identificadas pelo aparelho VITEK® 2 da Biomérieux. Este aparelho utiliza cartas de identificação e de antibiogramas através de suspensões de colónias puras com densidades estipuladas na escala de McFarland (recorre a testes bioquímicos e a substratos que medem a utilização de fonte de carbono, atividade enzimática e resistência). As colónias que não se encontram puras deverão ser repicadas para posterior identificação das mesmas no equipamento.

Existem vários testes que orientam o técnico a selecionar a melhor carta de identificação como o teste da catalase, teste da oxidase e testes de aglutinação. O teste da catalase, da Bio-Rad, permite distinguir *Staphylococcus* sp. (catalase positivo) de *Streptococcus* sp. (catalase negativo). Este teste consiste na conversão peróxido de hidrogénio em oxigénio (forma bolhas quando é libertado) e água através da catalase produzida por estafilococos. O teste da oxidase, da BioMérieux, consiste na alteração de um composto incolor para azul na presença de citocromo oxidase (identificação presuntiva de *Neisseria* sp. e *Pseudomonas* sp.).

A identificação no equipamento VITEK® 2 é conseguida através da medição, após incubação, da turbidez ou dos produtos coloridos do metabolismo dos substratos presentes nas cartas. Os resultados dos diferentes testes bioquímicos são analisados pelo aparelho através da sua base de dados e posteriormente são fornecidas as percentagens da probabilidade de se tratar de determinado microrganismo.

As cartas de antibiograma possuem várias concentrações de antibióticos e permitem determinar a concentração mínima inibitória, ou seja, concentração de antibiótico a partir da

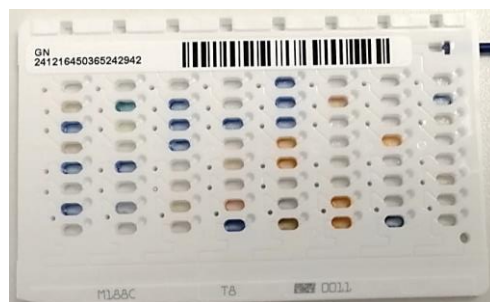


Figura 15- Carta de identificação para bactérias de Gram negativo contendo poços com diferentes substratos.

qual não se verifica crescimento bacteriano, apresentando o resultado como sensível, intermédio ou resistente segundo as normas do EUCAST.

**Tabela 2-** Cartas de identificação e de antibiograma consoante o tipo de microrganismo isolado nos meios de cultura.

Tipo de microrganismo isolado	Carta de Identificação	Carta de suscetibilidade aos antibióticos
Bacilos de Gram negativo	GN	AST-N426
Bactérias de Gram negativo aeróbias mais resistentes como <i>Pseudomonas</i> sp.	GN	AST-N427
Cocos de Gram positivo	GP	AST-P648 ( <i>Staphylococcus</i> sp.) AST-P586 ( <i>Enterococcus</i> sp. e <i>S. agalactiae</i> ) AST-STO3 ( <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. viridans</i> e estreptococos do grupo $\beta$ hemolíticos)
Leveduras	YST	
<i>Neisseria</i> sp. e <i>Haemophilus</i> sp.	NH	

O antibiograma de *Haemophilus* sp. e *Moraxella Catarrhalis* é efetuado manualmente através de um sistema de galerias recorrendo ao mesmo princípio de medição que o VITEK® 2. Os sistemas de galerias também são utilizados para antibiograma e identificação de *Ureaplasma* sp. (Figura 16) e *Mycoplasma* sp.



**Figura 16-** Exemplo de sistema de galeria para identificação de *Ureaplasma* sp.

#### 4.3.7. Espermograma

No Labeto também se analisa o sémen para investigação de infertilidade masculina através da avaliação do tempo de liquefação, viscosidade, pH, mobilidade, vitalidade, contagem e morfologia dos espermatozoides.

#### 4.3.8. CASO CLÍNICO BACTERIOLOGIA

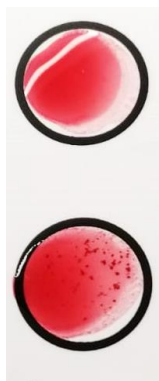
Uma mulher de 43 anos, numa cadeira de rodas, deslocou-se a um posto de colheitas do Labeto para efetuar o exsudado de uma lesão cutânea na perna. A ferida foi limpa com soro fisiológico e recolheu-se o material biológico, presente na mesma, com uma zaragatoa que foi entregue ao laboratório. Procedeu-se à coloração de Gram e observou-se raros cocos de Gram positivo e raros bacilos de Gram negativo. Efetuou-se a sementeira em meio MacConkey, CAN, COS e MSA. Após 24 horas realizou-se a leitura das placas e no meio CAN não se observou desenvolvimento micológico. No meio MacConkey observou-se colónias

sugestivas de *Pseudomonas aeruginosa* devido ao seu odor característico e realizou-se o teste da oxidase (oxidase positiva). O teste da oxidase positiva permite uma identificação presuntiva desta bactéria, no entanto, a identificação definitiva é efetuada no aparelho VITEK® 2 recorrendo-se à carta de identificação GN e à AST-N427 para determinar a suscetibilidade desta estirpe aos antibióticos.

No meio COS verificou-se hemólise da gelose de sangue e no meio MSA observou-se alteração da coloração do meio de rosa para amarelo ao redor das colónias que cresceram. Incubou-se o meio MSA e CAN mais 24 horas verificando-se, após 48 horas, que no meio CAN não se registou crescimento e no meio MSA a placa encontrava-se com o meio totalmente amarelo sugestivo de *Staphylococcus aureus* (Figura 17). Para confirmar o crescimento de *S. aureus* em MSA recorreu-se ao teste da catalase (catalase positivo). Com o intuito de corroborar a hipótese de se encontrar esta bactéria presente na ferida realizou-se um teste de aglutinação (kit *Pastorex Staph Plus*) de antígenos de *S. aureus* (IgG revestidos com partículas de látex específicos de antígeno de afinidade do fibrinogénio, proteína A e polissacarídeos capsulares) verificando-se uma aglutinação positiva (Figura 18) permitindo a identificação definitiva desta bactéria. Repicou-se a colónia de *S. aureus* presente no meio MSA para o meio CPSE para se realizar uma suspensão obtendo-se o antibiograma com a carta AST-P648 no aparelho VITEK® 2. O mesmo se efetuou nas colónicas sugestivas de *P. aeruginosa* presentes no meio MacConkey (Figura 19).



**Figura 17-** Placa com meio MSA incubada por 48 horas contendo crescimento de colónias de *S. aureus* que alteraram a coloração do meio de rosa para amarelo.



**Figura 18-** Resultado positivo em teste de aglutinação de pesquisa de antígenos de *S. aureus* do Kit *Pastorex Staph Plus*.



**Figura 19-** Placa com meio CPSE resultante da repicagem de 2 colónias: uma do meio MacConkey, sugestivo de *P. aeruginosa*, e outra do meio MSA identificadas como *S. aureus*.

O VITEK® 2 identificou a bactéria oxidase positiva como *P. aeruginosa* corroborando a presença de duas bactérias patogénicas na ferida.

Obteve-se o antibiograma anexado na tabela 3.

**Tabela 3-** Antibiograma obtido pelo VITEK® 2 para as duas estirpes isoladas.

Antibiograma para <i>S. aureus</i>			Antibiograma para <i>P. aeruginosa</i>		
Sensível	Intermédios	Resistente	Sensível	Intermédios	Naturalmente resistente
Oxacilina, Meticilina, Amoxicilina +Ácido Clavulânico, Imipenem, Moxifloxacina, Gentamicina, Tetraciclina, Eritromicina, Daptomicina, Clindamicina e Cotrimoxazol.	Ciprofloxacina e Levofloxacina.	Penicilina G e Ácido Fusídico.	Amicacina e Tobramicina.	Piperacilina+ Tazobactam, Cefazidima, Cefepima, Aztreonam, Imipenem, Ciprofloxacina e Levofloxacina.	Ampicilina, Amoxicilina+Ácido clavulânico, Cefazolina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ertapeneme, Tigeciclina e Cotrimoxazol.

Uma vez que a *P. aeruginosa* apresenta bastantes resistências o clínico deverá ser criterioso na terapêutica implementada. Numa infeção por duas bactérias o ideal seria administrar um único antibiótico com capacidade de erradicação das duas. No entanto, uma vez que neste caso a *P. aeruginosa* não apresenta sensibilidade aos mesmos antibióticos que *S. aureus*, o mais indicado, no caso de infeção, será uma terapêutica com recurso a dois antibióticos. No entanto, antes da administração desta terapêutica seria recomendado a análise do historial clínico da doente e de outros exames laboratoriais assim como o doseamento da PCR e quantificação de leucócitos de modo a verificar se o crescimento destas bactérias se deve a uma infeção ou a uma colonização.



## V. HEMATOLOGIA

No sector de hematologia efetuam-se hemogramas, análise de esfregaços sanguíneos, determinação da velocidade de sedimentação, testes de coagulação, eletroforese de hemoglobina e quantificação de HbA1c que, embora seja um teste bioquímico, por gestão de amostras, realiza-se no setor de hematologia.

O hemograma é uma das análises mais requisitadas pelos clínicos pois a quantificação e estudo da morfologia das células sanguíneas e das células precursoras imaturas permite auxiliar no diagnóstico e monitorizar diversas patologias como anemias, talassemias, leucemias, entre outras.

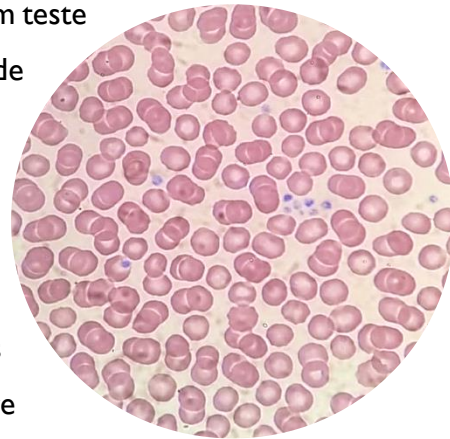
As células sanguíneas circulantes derivam de células estaminais pluripotentes que, por ação de fatores de crescimento, se diferenciam em três tipos principais de células com diferentes funções: Eritrócitos, Plaquetas e Leucócitos (15).

O hemograma consiste na quantificação de elementos figurados no sangue, incluindo o eritrograma (quantificação de eritrócitos, de hemoglobina, do hematócrito, de reticulócitos, VCM, HCM, CHCM, RDW), leucograma (quantificação absoluta e relativa de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) e plaquetograma (MPV e PDW).

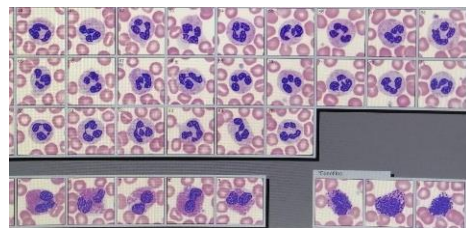
As amostras sanguíneas são colhidas para tubos de EDTA (utilização de sangue total) identificados com códigos de barras que são lidos pelo aparelho Sysmex XN-1000™. Este equipamento faz o hemograma por citometria de fluxo fluorescente. Hemogramas com resultados anormais implicam a realização de esfregaços de sangue periférico com a coloração de May-Grünwald-Giemsa de forma automatizada. O Sysmex XN-1000™ também permite efetuar a quantificação opcional de reticulócitos (eritrócitos imaturos).

O resultado do hemograma é enviado para o sistema informático assim como as fotografias digitais capturadas da lâmina com o esfregaço de sangue periférico (Figura 20).

O programa EPU de Sysmex permite a visualização das lâminas e categoriza as células capturadas auxiliando a sua identificação (Figura 21).



**Figura 20-** Esfregaço sanguíneo periférico corado com a coloração de May-Grünwald-Giemsa observando-se agregados plaquetários responsáveis por uma pseudotrombocitopenia.



**Figura 21-** Imagem de esfregaço sanguíneo obtida e selecionada pelo aparelho onde se visualizam neutrófilos, eosinófilos e basófilos.



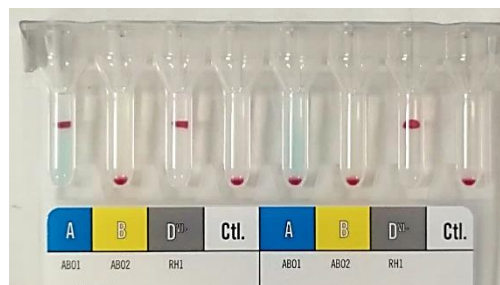
A interpretação dos resultados obtidos é realizada com base na observação de alterações de morfologia das células da linhagem linfóide e mieloide e os resultados do hemograma, leucograma e plaquetograma.

A velocidade de sedimentação eritrocitária, (velocidade de sedimentação de hemácias num tubo vertical) utilizada para avaliar processo inflamatório, neoplásico ou infecciosos (16) é realizada no aparelho TESTI e valida-se o resultado obtido comparando-se o mesmo com o historial do utente assim como a existência de patologias documentadas e o resultado de outras análises.

A eletroforese das hemoglobinas, realizada pelo aparelho Capillarys Tera 3, pelo método de capilaridade (12 capilares), permite a quantificação das diferentes hemoglobinas assim como possíveis variantes auxiliando o diagnóstico de talassemia e anemia falciforme.

Os testes de coagulação são efetuados no aparelho Sysmex® CS-5100 e são quantificados no plasma (colheita em tubo com coagulante citrato de sódio) os níveis de Fibrinogénio, de Antitrombina III, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT), Tempo de protrombina, D dímeros e Anticoagulante Lúpico.

A determinação dos grupos sanguíneos do sistema ABO e sistema Rh baseia-se em técnicas imunológicas. Esta análise realiza-se no sector de hematologia devido à gestão de amostras. É efetuada no aparelho Grifols Wadiana que possui cards com oito microtubos contendo anticorpos mononucleares específicos (anti-A, anti-B e anti-D) e controlo. A aglutinação dos antígenos presentes nos eritrócitos no soro do paciente com o correspondente anticorpo permite a determinação do grupo sanguíneo (prova globular).



**Figura 22-** Cards utilizados para determinação de grupo sanguíneo do sistema ABO e sistema Rh para duas amostras verificando-se aglutinação na zona superior dos microtubos. Primeira amostra grupo sanguíneo A+ e segunda amostra grupo sanguíneo O+.

O teste de Coombs direto permite a pesquisa de anticorpos ligados aos eritrócitos e responsáveis por hemólises imunológicas, mais frequentemente autoanticorpos. Esta análise é feita no sangue total (tubo com anticoagulante EDTA). O teste de Coombs indireto pesquisa anticorpos no soro do utente (17). Os testes de Coombs são realizados no aparelho Wadiana da Grifols.

## VI. BIOQUÍMICA

O sector de bioquímica está interligado com o sector de imunologia/endocrinologia visto que alguns aparelhos utilizados para determinação de parâmetros bioquímicos se encontram em cadeia com alguns equipamentos que analisam parâmetros de imunologia/endocrinologia.

O Labeto possui no CoreLab uma cadeia automatizada da APTIO que é constituída por um módulo de entrada de amostras (soro e urina), um descapsulador, um alíquotador de amostras, dois aparelhos Advia 2400 (sistema de química clínica), três equipamentos Advia Centaur (sistema de imunoensaio para análises imunologia/endocrinologia), um aparelho Sysmex® CS-5100 (coagulação), um sistema de selagem dos tubos e um sistema de armazenamento de amostras refrigerado.

O aparelho RAPIDLab® permite a quantificação de cálcio ionizado por potenciometria.

A pesquisa de drogas de abuso na urina como Cannabis (THC), Cocaína, Opióides (Morfina), Benzodiazepina e Anfetaminas são efetuadas através de testes rápidos por imunocromatografia (lateral flow assay) não automatizados.

**Tabela 4-** Aparelhos utilizados no sector de Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia, princípios de medição dos mesmos e analitos quantificados.

Aparelho utilizado	Princípios de Medição	Parâmetros de Bioquímica e Imunologia/Endocrinologia quantificados
<b>ADVIA 2400</b> (Química clínica)	Potenciometria	Sódio, Potássio e Cloreto.
	Espectrofotometria	ALT, AST, Amilase, Lipase, CK, Cálcio, Creatinina, Colesterol (Total, HDL e LDL), Bilirrubina (Total e Direta), Fosfatase alcalina, Gama-GT, Glicose, Fósforo inorgânico, LDH, Magnésio, Proteína Total, Albumina, Capacidade Total de Ligação do Ferro, Ferro, Ureia, Triglicéridos e Ácido úrico.
	Imunoturbidimetria	Alfa-1-Antitripsina, Transferrina, $\beta$ 2-Microglobulina, Complemento (C3 e C4), PCR, Imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG), Fator reumatoide e Microalbuminúria.
	Imunoensaio competitivo	Carbamazepina e Ácido Valproico.
<b>ADVIA Centaur</b> (Imunologia/Endocrinologia)	Quimioluminescência de imunoensaio competitivo	Cortisol, Estradiol, Folato, T3 e T4 (Livre e Total), Progesterona, Testosterona Total, Vitamina B12, Vitamina D 25(OH) Total, Anti-Tg e Hepatite A (anticorpos totais).
	Quimioluminescência de ELISA em "sanduiche"	Alfa-fetoproteína, Ferritina, TSH, FSH, Insulina, PTH intacta, LH, FSH, Prolactina e hCG total, Anti-Tg, CEA, CA199, CA125 e CA153, IgG e IgM anti Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus, Hepatite A (IgM), Hepatite B (anticorpos HBc IgM e totais, anticorpos anti-HBs e anti-HBe, antígeno HBs e antígeno HBe), Hepatite C (anticorpo IgG) e HIV (antígeno p24 e anticorpo).
<b>Capillarys 3 Octa</b>	Eletroforese (capilaridade)	Albumina, $\alpha$ -1-globulina ( $\alpha$ -1 glicoproteína ácida e $\alpha$ -1-antitripsina), $\alpha$ -2-globulina (haptoglobina e $\alpha$ -2-macroglobulina), $\beta$ -1-globulina (hemopexina e transferrina), $\beta$ -2-globulina (complemento) e $\gamma$ -globulina (imunoglobulinas IgA, IgM e IgG).

<b>Immulate 2000</b>	Quimioluminescência de imunoensaio	ACTH, Androstenediona, DHEA, <i>H. pylori</i> IgG, Tiroglobulina e Homocisteína.
<b>Phadia Prime 250</b>	Imunoensaio fluoroenzimático	Calprotectina fecal, anti-Transglutaminase IgA, anti-Transglutaminase IgG, anti-Gliadina IgA e anti-Gliadina IgG e IgE totais e específicos para alérgenos (rastreamento de alergias alimentares e respiratórias).
<b>VIDAS</b>	ELFA	CKMB, Troponina I e Pró-BN, vírus Epstein-Barr IgM anti-VCA e IgG anti-VCA e confirmações dos resultados obtidos relativamente ao diagnóstico de infecção por Citomegalovírus, HIV e Hepatite B.
<b>Maglumi X3</b>	Quimioluminescência de imunoensaio	Testosterona livre, Peptídeo C, Aldosterona (do soro e urinária), IGF, Renina direta, 17-OH Progesterona, AMH, anticorpos TRAb, Anti-dsDNA e ENA.

## 6.1 Princípios de medição dos equipamentos

### a) Potenciometria

A potenciometria é um método eletroanalítico que consiste na medição das propriedades elétricas de uma espécie química em solução. Desta forma a potenciometria, ao utilizar eletrodos, permite a medição do potencial de uma célula eletroquímica na ausência de corrente no sistema. Recorre-se a um eletrodo de referência com potencial conhecido (independente da concentração do analito) e a um eletrodo indicador que desenvolve um potencial dependente da concentração do analito na amostra (18). A diferença de potencial dos eletrodos fornece a concentração do analito na amostra.

### b) Espectrofotometria

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer baseando-se na medida de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (19). Esta técnica permite a medição da concentração de analitos presentes nas amostras através da comparação da medida da energia radiante que é absorvida por uma solução amostra e a que é absorvida por uma ou várias soluções-padrão uma vez que a concentração de um analito relaciona-se com a intensidade de absorção de um produto formado a partir do mesmo. As concentrações da maioria das enzimas, como Lípase, Amilase, Transaminases, Fosfatase alcalina e Gama-GT, são doseadas através da absorvância de produtos formados por reações químicas através da atividade destas enzimas.

### c) Imunoturbidimetria

No Labeto recorre-se a imunoensaios para determinar a concentração de determinados analitos. Estes imunoensaios consistem na adição de um anticorpo (proteína

produzida pelo sistema imunitário em resposta a uma molécula estranha designada antigénio) para detetar o analito de interesse (20). O anticorpo adicionado reconhece o antigénio específico ocorrendo a formação de um complexo antigénio-anticorpo (21). Este complexo provoca um incremento da turbidez da amostra que é medida como a quantidade de luz absorvida, num determinado comprimento de onda (quanto maior a concentração do analito maior será a turbidez e conseqüentemente a absorvância). A concentração do analito é determinada recorrendo-se a uma curva de calibração construída a partir da absorvância de calibradores. Nalguns ensaios recorre-se ao uso de partículas de latex revestidas com anticorpos específicos permitindo uma rápida aglutinação formando-se agregados que aumentam a sensibilidade da reação.

#### **d) Imunoensaio competitivo**

O imunoensaio competitivo consiste na adição de uma concentração conhecida de antigénio, marcado com enzimas, que compete com o antigénio livre na amostra (analito) pelo um número limitado de anticorpos imobilizados. Deste modo, a probabilidade do antigénio marcado se ligar ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração do antigénio não marcado pelo que a concentração de antigénio marcado ligado é inversamente proporcional à concentração do analito (20).

#### **e) Quimioluminescência**

A quimioluminescência é um tipo de luminescência que se baseia na emissão de radiação por uma espécie excitada formada durante uma reação química (18) recorrendo-se à marcação com compostos quimioluminescentes. Nos imunoensaios competitivos o antigénio adicionado é marcado por compostos quimioluminescentes como éster de acridínio e nalguns ensaios o anticorpo específico do analito na fase sólida encontra-se marcado com estreptavidina. Nos imunoensaios de ELISA em sanduíche o primeiro anticorpo que se ligará ao antigénio/analito a ser mensurado é marcado com éster de acridínio e nalguns ensaios o segundo anticorpo é biotilado e ligado a estreptavidina.

#### **f) Imunoensaio fluoroenzimático**

O EliA consiste no revestimento de poços com anticorpos monoclonais específicos para os analitos a determinar que, se presentes na amostra do paciente, se ligam aos mesmos. Após remoção de compostos não ligados adiciona-se anticorpos específicos dos analitos marcados com enzimas (Conjugado) para formar um complexo analito-conjugado. Após lavagens, a fluorescência na mistura da reação é medida e quanto maior o valor da resposta, maior a concentração do analito na amostra sendo a resposta da amostra do paciente

comparada diretamente à resposta de calibradores. Se o analito a determinar for um anticorpo os poços são revestidos com peptídeos sintéticos de antigénio específico para o mesmo. Se presentes na amostra do paciente, os anticorpos ligam-se ao seu antígeno específico e de seguida recorre-se a anticorpos marcados por enzima contra o analito/anticorpo humano (Conjugado) formando um complexo anticorpo-conjugado que é medido através da fluorescência.

### g) Eletroforese das proteínas por capilaridade

A eletroforese de proteínas consiste na separação das proteínas no soro submetendo-as a um campo elétrico. As proteínas em meio básico adquirem uma carga negativa e devido ao campo elétrico migram do cátodo para o ânodo de acordo com a sua densidade de carga. Deste modo ocorre a separação de cinco frações (Figura 23). A eletroforese por capilaridade é mais rápida do que a eletroforese convencional e necessita de um menor volume de amostra e como possui detetores quantitativos não necessita de colorações posteriores (18).

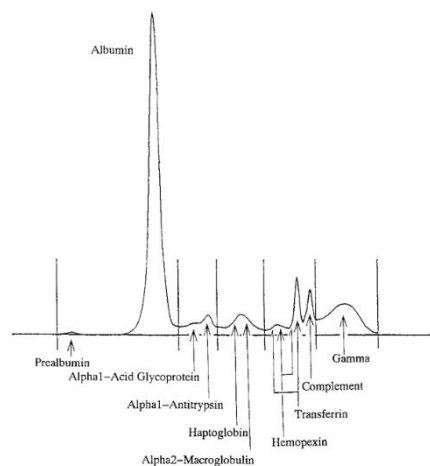


Figura 23- Padrão normal das proteínas séricas obtidas por eletroforese capilar. (22)

## 6.2 Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos, insolúveis em água, correspondem a um grupo de moléculas com estruturas muito diversas e com funções variáveis. Os mesmos são transportados no plasma por lipoproteínas e as dislipidemias, associadas a um efeito muito prejudicial à saúde, caracterizam-se por alterações na concentração lipídica. As lipoproteínas são estruturas esféricas que possuem uma superfície hidrofílica (fosfolípidos, apoproteínas e colesterol livre) que envolve um core hidrofóbico que contém triglicéridos e colesterol esterificado.

As classes de lipoproteínas que estão presentes no organismo são (organizadas por ordem crescente de densidade): Quilomicrons, VLDL, IDL, LDL, HDL e Lp(a).

### a) Colesterol total

O colesterol é um esteroide com várias funcionalidades no organismo pois permite a estabilidade das membranas, precursor de sais biliares, precursor de hormonas esteroides, entre outras funções. A hipercolesterolemia (fator de risco para aterosclerose) está associada a uma maior incidência de doenças cardiovasculares isquémicas pelo que a monitorização dos

níveis de colesterol sanguíneo desempenha uma medida de prevenção contra estas patologias e permite prever o risco cardiovascular.

### **b) Colesterol-LDL**

As LDL transportam a maioria do colesterol. Estas lipoproteínas expressam a apoproteína apoB-100 na sua superfície e, ao se ligarem a recetores, são internalizadas por endocitose. O lisossoma permite a hidrólise dos componentes da LDL libertando-se aminoácidos, ácidos gordos e colesterol livre. Desta forma o colesterol livre pode desempenhar as funções anteriormente referidas ou ser esterificado pela enzima Acil-CoA colesterol aciltransferase.

O aumento dos níveis de LDL (transportam 60% do colesterol) corresponde a um fator de risco para aterosclerose devido à sua acumulação na íntima das artérias e posterior oxidação das mesmas promovendo a formação de placas que podem provocar isquemia (interrupção do fluxo sanguíneo) e trombozes (23). A hipercolesterolemia familiar (mutação nos genes que codificam os recetores de LDL) e a hiperlipidémia familiar combinada (aumento da síntese de apoB-100) podem ser responsáveis pelo aumento do colesterol das LDL. O colesterol das LDL pode ser quantificado diretamente ou indiretamente pela fórmula de Friedwald.

### **c) Colesterol-HDL**

As HDL expressam à superfície a apoproteína apoE e a apoA-I que permite a esterificação do colesterol para o interior da lipoproteína. As HDL desempenham um papel antiaterogénico (17) pois permitem o transporte reverso do colesterol (transportam o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado), são anti-oxidantes (diminuem as LDL oxidadas), retiram colesterol dos macrófagos (diminuem a formação de células espumosas prevenindo a lesão primária de aterosclerose), anti-trombóticas e anti-apoptóticas.

### **d) Triglicéridos**

Os triglicéridos (glicerol esterificado e ácidos gordos) podem ter origem exógena (dieta) e endógena (sintetizados pelo fígado) e circulam na corrente sanguínea através de lipoproteínas (quilomicrons transportam os que derivam da dieta e as VLDL os que são produzidos no fígado). Os triglicéridos são armazenados no tecido adiposo para fornecer energia através dos ácidos gordos quando necessário.

As hipertrigliceridémias podem ser do tipo I (exógena) devido ao defeito da atividade da lipoproteína lipase (converte os triglicéridos presentes nas lipoproteínas em ácidos gordos livres e glicerol que são capturados pelo tecido muscular e adiposo), do tipo IV (endógena)

devido a uma hiperprodução de VLDL, do tipo V (rara) devido a um excesso de VLDL e quilomicrons. O aumento dos triglicéridos também se pode verificar em utentes com hiperlipidémia familiar combinada de tipo IIB e com DM desequilibrada, pancreatites, alcoolismo agudo e com síndrome nefrótica (17). A acumulação de triglicéridos no fígado pode provocar esteatose hepática.

### **6.3 Metabolismo dos Hidratos de carbono**

Os hidratos de carbono provenientes da dieta são convertidos em monossacarídeos no intestino e são, de seguida, absorvidos para a corrente sanguínea (24). A glicose é o monossacarídeo mais abundante sendo uma fonte essencial de obtenção de energia e de carbono para a síntese da maioria dos outros compostos. No período pós-prandial os níveis de glicose na corrente sanguínea aumentam ocorrendo uma estimulação da produção de insulina pelo pâncreas que promove o armazenamento da glicose no fígado sobre a forma de glicogénio (glicogénese). Nos períodos de jejum os níveis de glicose diminuem e ocorre a estimulação da produção de glucagina pelo pâncreas que ativa processos catabólicos como a glicogenólise no fígado (quebra da molécula de glicogénio aumentando os níveis de glicose) e promove a neoglicogénese (formação de moléculas de glicose através de glicerol, aminoácidos e lactato) (24).

#### **a) Glicose**

Como referido anteriormente a concentração de glicose no sangue é, em situações normais, mantida num intervalo estreito devido à ação da insulina e da glucagina (20) e é doseada através do método de Slein que utiliza enzimas hexoquinase e G6PD.

A glicémia é das análises mais solicitadas para despiste de *Diabetes mellitus* que é o distúrbio endócrino mais comum que, quando não tratado, pode acarretar complicações severas. Esta patologia caracteriza-se por hiperglicemia, que poderá ser acompanhada por alteração do metabolismo lipídico e proteico, geralmente devido à resistência à ação da insulina (DM tipo II) ou decréscimo da concentração desta hormona (DM tipo I) (24). A *Diabetes mellitus* pode ser secundária a outras patologias como por exemplo ao síndrome de Cushing. Segundo a Direção-Geral de Saúde, 2 valores de glicémia em jejum superior a 126 mg/dl (na ausência de patologia aguda simultânea), uma prova de PTGO com um valor, após as 2 horas, superior a 200 mg/dl e/ou uma HbA1c  $\geq 6,5\%$  fazem o diagnóstico de DM. A prova de PTGO é essencial para diagnóstico de diabetes gestacional nas mulheres grávidas. A hipoglicémia também é tida em conta principalmente se se tratar de um indivíduo diabético (17). A prova de PTGO na grávida realiza-se através do doseamento de glicémia em 3 tempos

(jejum, 1 hora e 2 horas após ingestão de solução com 75g de glicose diluída em 300ml de água). Em mulheres não grávidas e em homens a glicémia é medida em jejum e 2 horas após a ingestão da solução (se a glicémia em jejum não for inferior a 160mg/dl o utente não deverá realizar a prova).

#### **b) HbA1c**

A hemoglobina é uma proteína presente nos eritrócitos que possui quatro cadeias e grupo heme. Num adulto saudável a hemoglobina presente em maior quantidade é a HbA1, de seguida a HbA2 em menor percentagem e uma fração residual HbF (25).

A análise da hemoglobina glicada (HbA1c), produto da reação não-enzimática de glicose com a hemoglobina presente nos eritrócitos, é realizada no aparelho Capillarys Tera 3 (12 capilares) por eletroforese capilar. Este doseamento permite a monitorização e diagnóstico de DM pois as HbA1c são tanto mais elevadas quanto mais frequentes tenham sido os períodos de hiperglicemia durante os últimos 3 meses (17).

#### **c) Insulina**

A insulina, segregada nas células dos ilhéus de Langerhans pancreáticos, é a principal hormona que regula os níveis de glicose no sangue devido ao seu efeito hipoglicemiante (24). Este doseamento é efetuado com o intuito de distinguir DM tipo I (concentração de insulina diminuída) de DM tipo II (concentração normal ou elevada) (17).

### **6.4 Metabolismo das Proteínas**

#### **a) Eletroforese das proteínas séricas**

As proteínas desempenham variadas funções no organismo como função enzimática, resposta imune (imunoglobulinas), transporte, sinalização celular, hemóstase (fatores de coagulação), hormonal, estrutural e entre outras.

A eletroforese das proteínas séricas permite detetar anormalidades quantitativas (aumento ou diminuição de frações) e/ou qualitativas (presença de picos e de destorções). Esta análise permite a confirmação de inflamações (aumento das  $\alpha$ -1-globulina e sobretudo da  $\alpha$ -2-globulina), hepatites, cirroses (hipoalbuminemia e bloco  $\beta$   $\gamma$ ) ou perfil nefrótico (hipoalbuminemia, incremento da  $\alpha$ -2-globulinas e decréscimo das  $\gamma$ -globulinas) quando associada a outros parâmetros. Esta eletroforese é útil para identificar a presença de imunoglobulinas monoclonais (quando existe suspeita de mieloma múltiplo), para inferir infeções (hipergamaglobulinemia com aumento difuso/policlonal) e para monitorizar a evolução de doenças malignas e a eficácia de tratamentos com imunossuppressores (17).



## **b) Proteínas Totais**

A maioria das proteínas são produzidas pelo fígado e a proteína presente em maior quantidade no plasma é a albumina seguida de globulinas.

O incremento de proteínas totais pode ser devido a desidratação, hipergamaglobulinemia, paraproteína, entre outras causas. A diminuição das mesmas pode estar associada a alterações da síntese como insuficiência hepática, catabolismo ou perdas, sobre hidratação e desnutrição ou mal-absorção.

A albumina é responsável pelo transporte de diversas moléculas lipossolúveis na corrente sanguínea assim como permitir a manutenção da pressão oncótica (passagem de fluido intersticial para o extracelular evitando edemas) e apresenta capacidade tampão (24). A hipoalbuminemia pode ser causada por uma distribuição anormal visto que é uma proteína de fase aguda (aquando da fase aguda verifica-se um aumento da permeabilidade de capilar), síntese diminuída (má nutrição, má absorção ou insuficiência hepática), diluição por hiperhidratação e catabolismo excessivo (síndrome nefrótico, enteropatias, queimaduras, entre outras causas). A hiperalbuminemia pode estar associada a dietas hiperproteicas e a desidratação.

## **6.5 Metabolismo Mineral**

O metabolismo mineral envolve a homeostasia de cálcio, fosfato e magnésio pela PTH e vitamina D com a ação de diversos órgãos como o rim, intestinos, ossos e a paratiroide. Deste modo o doseamento destes minerais pode refletir o funcionamento dos órgãos referidos anteriormente.

### **a) Cálcio**

A grande maioria do cálcio encontra-se no esqueleto (99%) mas a sua concentração baixa no plasma continua a ser essencial para intervir como efector de numerosas enzimas. O cálcio plasmático existe sob a forma não difundível (ligado a proteínas plasmáticas) e na forma difundível (a maioria na forma ionizada e fisiologicamente ativa) (17).

A concentração plasmática de cálcio depende da ação de PTH (promove diretamente a reabsorção de cálcio nos rins e nos ossos e indiretamente a absorção intestinal de cálcio por induzir síntese de vitamina D no rim) e de vitamina D (promove a absorção intestinal de cálcio). Deste modo o aumento de PTH (sintetizada nas glândulas paratiróides) e vitamina D (forma ativa produzida no rim) incrementam a concentração plasmática de cálcio.

Uma hipocalcemia pode ser causada por hipoalbuminemia (albumina é a proteína predominante no transporte de cálcio no plasma), por insuficiência renal (diminui síntese de vitamina D e ação de PTH), por deficiência de magnésio (é importante para a secreção de PTH logo o seu déficit promove uma diminuição desta hormona), por hipoparatiroidismo (déficit de PTH), pancreatite aguda (precipitação de cálcio no intestino), por deficiência de vitamina D ou por rápida mineralização óssea por osteoblastos.

Uma hipercalcemia pode ser devida a um hiperparatiroidismo ou a uma neoplasia óssea.

## **b) Fosfato**

O fosfato é um anião abundante no corpo possuindo várias funções como a capacidade tampão. A concentração plasmática de fosfato depende da ação de PTH (diminui reabsorção de fosfato no rim e aumenta a sua reabsorção no intestino).

A hiperfosfatemia pode dever-se a uma insuficiência renal crônica (diminui excreção renal), a acromegalia (a hormona do crescimento aumenta a reabsorção tubular de fosfato), a hipoparatiroidismo, ao aumento da ingestão e à saída de fosfato das células (quimioterapia, graves rabdomiólises e hemólise).

A hipofosfatemia pode ser causada por perda renal (hiperparatiroidismo), diminuição da absorção intestinal, entrada nas células (pico de insulina ou alcalose respiratória) ou por alcoolismo agudo.

## **c) Magnésio**

O magnésio é o quarto cátion mais abundante no organismo e encontra-se principalmente nos ossos.

As hipermagnesemias surgem nas insuficiências renais, que diminuem a excreção urinária do cátion, e na utilização exagerada de antiácidos que contêm magnésio. As hipomagnesemias podem resultar de uma carência alimentar, de perdas digestivas (diarreia, má absorção, entre outras), de medicamentos que diminuem a reabsorção tubular do cátion e provocam perdas urinárias e de alcoolismo.

## **d) Vitamina D**

Vitamina D é obtida pela dieta e sintetizada na pele através de raios UV, posteriormente sofre uma hidroxilação no fígado resultando em 25-hidroxicolecalciferol que é sujeita a uma segunda hidroxilação nos rins formando-se a forma ativa de vitamina D. Como foi referido anteriormente esta vitamina é essencial para a absorção intestinal de cálcio e fósforo logo é necessária para o crescimento e reparação dos ossos. O déficit de vitamina D

pode ser devido a deficiência da mesma na alimentação, pouca exposição solar, doença renal crónica, entre outras causas.

## **6.6 Avaliação Pancreática**

O pâncreas desempenha uma função endócrina (produção de hormonas) e exócrina (produção de suco pancreático com enzimas permitindo a digestão de moléculas). Aquando de uma patologia pancreática a porção exócrina é a primeira a ser alterada. Com o intuito de auxiliar no diagnóstico de pancreatite aguda o laboratório doseia a lipase e a amilase.

### **a) Lipase**

A lipase é uma enzima produzida pelo pâncreas e desempenha uma função essencial ao hidrolisar os ésteres de glicerol (na presença de co-lipase e sais biliares) e ao permitir a digestão de gorduras. Uma lipasémia aumentada, três vezes superior ao limite superior da normalidade, na ausência de lesão renal, pode ser sugestiva de uma pancreatite aguda (17). Uma vez que a lipase é predominantemente produzida pelo pâncreas esta enzima é bastante específica de patologias neste órgão (específica e sensível).

### **b) Amilase**

A amilase é uma enzima produzida pelo pâncreas e pelas glândulas salivares responsável pela digestão do amido. Uma vez que esta enzima é maioritariamente produzida pelas glândulas salivares não é específica de lesão pancreática, no entanto, quando associada a uma elevada lipasemia pode ser indicativa de pancreatite aguda (17).

## **6.7 Avaliação Renal**

Os rins desempenham funções essenciais à homeostasia do organismo como regular o volume de água e eletrólitos, sintetizar hormonas (eritropoietina, forma ativa de vitamina D e renina), eliminar compostos tóxicos, permitir o equilíbrio ácido-base e a manutenção do volume e composição do fluido vascular. Para se realizar o estudo da função renal avalia-se a função glomerular (capacidade de filtração e integridade da barreira de filtração glomerular) e a função tubular (capacidade de secreção e de reabsorção). Existem várias patologias renais como síndrome nefrítica, necrose tubular aguda, insuficiência renal e entre outras. A insuficiência renal aguda caracteriza-se por perda de função renal de forma súbita (redução da taxa de filtração glomerular) e a insuficiência renal crónica por destruição progressiva do tecido renal (irreversível) e se, não tratada por diálise ou transplante, poderá ser fatal.

### **a) Creatinina**

A creatinina resulta do catabolismo da creatina muscular sendo eliminada exclusivamente pelo rim por filtração, não sendo nem secretada nem reabsorvida no túbulo. O doseamento da concentração de creatinina no sangue auxilia na avaliação da filtração glomerular, uma vez que quando esta se encontra comprometida a concentração deste catabólito no sangue aumenta. É doseada através da absorvância do composto formado pela reação química de creatinina com ácido pícrico.

A creatinina pode-se elevar em casos de insuficiência renal crónica ou aguda assim como em casos de rabdomiólise. A clearance da creatinina, obtida pela fórmula de Cockcroft-Gault, permite avaliar a taxa de filtração glomerular possibilitando a monitorização de doentes com insuficiência renal.

### **b) Ureia**

A ureia é produzida essencialmente pelo fígado como resultado do catabolismo de proteínas sendo eliminada pelo rim e reabsorvida passivamente no túbulo. A ureia é pouco específica no entanto pode-se verificar um aumento da sua concentração sérica em casos de insuficiência renal, insuficiência hepatocelular, aumento de ingestão proteica, estado hipercatabólico e desidratação.

### **b) Ácido úrico**

O ácido úrico é proveniente do catabolismo das purinas de origem alimentar, de síntese endógena ou de catabolismo de ácidos nucleicos sendo eliminado maioritariamente pelo rim. A hiperuricemia pode se verificar em casos de insuficiência renal (pouco sensível e pouco específico), de hiperprodução metabólica (dieta, leucemias e síndrome de Lesch e Nyhan) e alcoolismo. A hiperuricemia é um fator de risco para desenvolver gota (doença metabólica caracterizada por precipitação de cristais de urato). A hipouricemia pode se dever a uma doença hepatocelular severa, ao aumento da eliminação renal, ao tratamento farmacológico prolongado e à deficiência da atividade de xantina-oxidase.

### **c) Microalbuminúria**

A microalbuminúria consiste na presença de pequenas quantidades de albumina na urina (inferior ao nível de deteção nas tiras reagentes), ou seja, quando existe um valor de albuminúria de 300mg/dia. Um valor superior a 30mg/dia de albumina na urina é patológico logo o seu doseamento auxilia no diagnóstico de nefropatia em estágios iniciais (lesão glomerular), particularmente nos diabéticos.

## **6.8 Avaliação Hepática**

O fígado desempenha funções de síntese, função de excreção, função de desintoxicação e função metabólica (metabolismo de hidratos de carbono e manutenção de glicemia).

Com o intuito de avaliar a função de síntese doseia-se a concentração de albumina e o tempo de protrombina (fatores de coagulação dependem de capacidade de síntese do fígado). Para investigar possível lesão hepatocelular doseiam-se as transaminases e para investigar possível colestase (interrupção do fluxo biliar) doseia-se a fosfatase alcalina e a gama GT.

### **a) Transaminases**

As transaminases são enzimas que migram para o soro em caso de lise hepática ou muscular (17). No Labeto avaliamos a atividade da ALT (GPT), que se encontra presente no fígado, e da AST (GOT), presente no coração e em menores quantidades no fígado.

As transaminases podem estar elevadas em caso hepatites virais, hepatites medicamentosas, hepatite alcoólica, hepatite crónica, esteatose hepática, enfarto do miocárdio, entre outras patologias.

### **b) Bilirrubina**

A bilirrubina é uma substância/pigmento que se liberta para a corrente sanguínea quando ocorre destruição de hemoglobina. A bilirrubina não conjugada (indireta), transportada no plasma ligada a albumina, sofre uma glicuroconjugação no fígado (bilirrubina conjugada/ direta) sendo posteriormente excretada nas vias biliares e no intestino é convertida em urobilinogénio e estercobilinogénio que são oxidados em urobilina e estercobilina e são eliminadas na urina e nas fezes (a maior parte). A bilirrubina conjugada é doseada através da absorvância da biliverdina resultante da reação da bilirrubina conjugada com vanadato.

As hiperbilirrubinemias não conjugadas podem ser resultantes de hemólise e de defeito na glicuroconjugação (doença de Gilbert). As hiperbilirrubinemias conjugadas associam-se a colestase por obstrução biliar extra-hepática ou intra-hepática verificando-se normalmente níveis mais elevados de urobilinogénio na urina (17).

### **c) Fosfatase Alcalina**

As isoenzimas de fosfatase alcalina circulantes provêm maioritariamente do fígado e dos ossos. Verifica-se o incremento desta enzima na corrente sanguínea em situações de lesões hepáticas como colestase (acompanhada por elevação de gama-GT) ou de lesões ósseas como raquitismo, osteoporose e entre outras patologias.

#### **d) Gama-GT**

A gama-GT é uma glicoproteína presente em vários órgãos e em menor quantidade no fígado (pouco específica). A gama-GT encontra-se muito elevada em casos de colestase hepática, nos carcinomas hepatocelulares e nas metástases hepáticas. O incremento da concentração plasmática desta enzima também pode ser devido a alcoolismo assim como à terapêutica com determinados fármacos.

### **6.9 Equilíbrio Hidro-eletrolítico**

#### **a) Sódio**

O sódio é um catião que se encontra maioritariamente no plasma e as variações da sua concentração promovem movimentos hídricos. Deste modo a quantidade de sódio no compartimento extracelular determina o seu volume. A hiponatremia (concentração de sódio no sangue reduzida) é responsável por uma osmolalidade plasmática baixa e pode ser devida a um défice de sódio ou a uma sobrecarga hídrica do meio extracelular, ou seja, sobre hidratação. As hiponatremias associadas a diminuição de sódio podem estar relacionadas com perdas urinárias, com perdas digestivas, transpiração excessiva, doença renal, hipoaldosteronismo, diurese osmótica provocada por *diabetes mellitus* e entre outras causas. A hipernatremia (concentração de sódio na corrente sanguínea elevada) pode estar associada a um fornecimento excessivo de sódio ou a desidratação e pode verificar-se em casos de insuficiência cardíaca (estimula a aldosterona a promover a reabsorção de sódio), de doença hepática e de doença renal.

#### **b) Cloreto**

O cloro é um dos aniões mais importantes no plasma. O aumento da concentração de cloro no plasma associa-se geralmente a hipernatremias uma vez que este anião é o contraíão do sódio. A hiperclorémia também se pode associar a alcalose respiratória e a acidose metabólica. As hipocloremias associam-se a hiponatremias, a acidose respiratória e a acidose metabólica.

#### **d) Potássio**

O potássio é o principal catião intracelular, intervém em vários processos bioquímicos da célula e é essencial na manutenção da pressão oncótica celular. As hipercaliemia podem-se verificar quando ocorre um excesso de ingestão de potássio, insuficiência renal (diminuição da excreção deste ião), acidose respiratórias e metabólicas, deficiência de aldosterona (doença de Addison) e lesão tecidual. As hipocaliemias podem resultar de deficiências dietéticas,

perdas gastrointestinais, diuréticos, perda renal, alcalose, aldosteronismo e síndrome de Cushing.

## 6.10 CASO CLÍNICO BIOQUÍMICA

Um homem de 66 anos deslocou-se a um posto de colheitas na Beatriz Godinho para realizar uma colheita sanguínea. O utente inferiu que se encontrava medicado para DM, hipertensão arterial, ácido úrico e anticoagulante.

O utente foi diagnosticado em 2011 com DM uma vez que apresentava uma HbA1c de 8,6% e uma glicémia de 188 mg/dL acompanhada de glicosúria. Apresentava histórico, desde 2016, de anemia e de níveis elevados de ureia e creatinina. Os valores obtidos do hemograma e química clínica encontram-se na tabela em anexo (Tabela 5). O leucograma não apresentava alterações assim como a contagem de plaquetas.

**Tabela 5-** Dados laboratoriais obtidos do utente.

<b>Eritrograma</b>	RESULTADO OBTIDO	VALORES DE REFERÊNCIA	UNIDADES DE MEDIDA
Eritrócitos	4,23	4,31 - 6,40	$\times 10^{12}/L$
Hemoglobina	12,30	13,60 - 18,00	g/dL
Hematócrito	0,37	0,40 - 0,52	L/L
VGM	88,20	80,00 - 97,00	fL
HGM	29,10	26,00 - 34,00	pg
CHGM	33,00	32,00 - 36,00	g/dL
RDW	13,40	11,50 - 15,00	%
<b>Química clínica</b>			
Ureia	108	19 - 49	mg/dL
Creatinina	2,74	0,70 - 1,30	mg/dL
Ácido úrico	9,2	3,7 - 9,2	mg/dL
Glicémia	178	70 - 110	mg/dL
<b>Endocrinologia</b>			
Paratormona – hPTH	310,6	18,4 - 80,1	pg/ml
<b>Ionograma</b>			
Sódio	142	132 - 146	mmol/L
Potássio	4,8	3,5 - 5,5	mmol/L
Cloretos	104	99 - 109	mmol/L
<b>Química Clínica Urinária</b>			
Proteinúria	161	1 - 14	mg/dL
<b>Urina Tipo II</b>			
Glicose	1+		
Proteínas	3+		

Com estes resultados verificamos que a função renal está comprometida através dos elevados níveis de ureia e creatinina no plasma (diminuição de taxa de filtração glomerular) e de proteinúria (perda de integridade de barreira de filtração glomerular), correspondendo

esta situação a uma insuficiência renal. Uma vez que este histórico se regista há mais de 3 meses (7 anos), o utente apresenta um diagnóstico de insuficiência renal crónica.

Como o rim é responsável pela produção de eritropoietina, hormona que promove a produção de eritrócitos, numa insuficiência renal verifica-se a diminuição da mesma provocando uma anemia corroborada pelos níveis reduzidos obtidos de hemoglobina (anemia normocítica normocrómica).

Uma vez que o rim é responsável pela produção da vitamina D ativa, a falha de funcionalidade deste órgão promove a diminuição desta vitamina (responsável por induzir a absorção de cálcio no intestino). Deste modo, é habitual verificar-se uma diminuição de absorção de cálcio intestinal ocorrendo uma diminuição de cálcio ionizado e total no plasma.

Como mecanismo de *feedback* de manutenção de concentração de cálcio no plasma liberta-se a hormona PTH com o intuito de promover a reabsorção de cálcio no rim e nos ossos. O rim encontra-se incapaz de o reabsorver, no entanto a PTH continua a ser produzida e libertada em elevadas quantidades, como se pode verificar nos resultados obtidos, promovendo a mobilização de cálcio dos ossos. A longo prazo, a mobilização exacerbada de cálcio na estrutura óssea poderá provocar lesões ósseas que se relacionam com o incremento de fosfatase alcalina na corrente sanguínea.

Existem várias causas de insuficiência renal, como DM não controlada e hipertensão, e neste caso clínico é evidente a relação da função renal com o metabolismo mineral, com a população de eritrócitos e com a endocrinologia.



## VII. IMUNOLOGIA / ENDOCRINOLOGIA

Como foi referido anteriormente, os aparelhos utilizados para realizar as análises imunológicas/endocrinológicas (ADVIA Centaur) estão integrados na cadeia do CoreLab. Os restantes equipamentos, assim como os analitos quantificados e o princípio de medição, estão referidos na Tabela 4.

### TIG

No Labeto realizam-se testes imunológicos de gravidez na urina ou no sangue através da técnica de “lateral flow assay” para pesquisa da hormona hCG. A presença desta hormona é revelada com o aparecimento de 2 bandas coloridas e a sua ausência com 1 banda (apenas a de controlo).

### Alergologia

No aparelho Phadia™ 250 procede-se à pesquisa de IgE totais e IgE específicos para alérgenos permitindo o rastreio de variadas alergias alimentares e respiratórias.

### Serologia infecciosa

Antígenos e anticorpos produzidos pela resposta imunológica contra os vírus da Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, HIV, Citomegalovírus e Rubéola são determinados no aparelho ADVIA Centaur assim como os anticorpos produzidos contra o parasita *Toxoplasma gondii*. Os anticorpos produzidos contra a cápside do vírus Epstein-Barr (IgM anti-VCA e IgG anti-VCA) são doseados no aparelho VIDAS (Tabela 4).

O rastreio da Sífilis, infeção sexualmente transmissível provocada pela bactéria *Treponema pallidum*, é efetuada por testes não treponémicos (VDRL) e/ou testes treponémicos (pesquisa de anticorpos específicos no aparelho Immulite ou por imunofluorescência indireta/ FTA-ABS). O teste de VDRL (Figura 24) baseia-se na adição da amostra a uma suspensão com antígeno cardiolipídico contendo micropartículas de carvão que aglutinará com a reagina no soro de um paciente infetado (em casos positivos realiza-se a titulação).



**Figura 24-** Resultado positivo à esquerda de teste VDRL e negativo à direita.

No sector de imunologia efetuam-se outras técnicas não automatizadas como Rosa de Bengala (suspensão bacteriana para pesquisa de anticorpos anti-*Brucella*), Reação de Widal (antígenos bacterianos para pesquisa de anticorpos anti-*Salmonella*), Reação de Wright

(pesquisa de anticorpos anti-*Brucella*), Reação de Weil-Félix (pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsias*) e Reação de Paul-Bunnell (partículas de látex revestidas com antigénio para pesquisa de anticorpo heterófilo associado à infeção pelo vírus Epstein-Barr que provoca mononucleose infecciosa).

### **Autoimunidade**

No sector de imunologia realiza-se o teste Waaler Rose para pesquisa do autoanticorpo Fator Reumatóide (eritrócitos revestidos com anticorpos para pesquisa de fator reumatóide).

No Labeto efetua-se, entre outras análises, a pesquisa de autoanticorpos como por exemplo, ANA, ASMA e ANCA responsáveis por patologias autoimunes através de técnica de imunofluorescência indireta por visualização no microscópio de fluorescência.

Como foi referido anteriormente (Tabela 4), a deteção de anticorpos TRAb, Anti-dsDNA e ENA é realizada no aparelho Maglumi X3.

### **Avaliação da Função Tiroidea**

A TSH é produzida pela adenohipófise, em resposta à TRH produzida pelo hipotálamo, e estimula a tiroide. O hipotiroidismo consiste na diminuição das hormonas tiroideias, principalmente a T4 livre, e pode estar associado a um problema na tiroide (elevação de TSH) ou a uma patologia na hipófise ou nos recetores (diminuição de TSH). Uma das causas mais frequentes de hipotiroidismo é a Tiroidite de Hashimoto (doença autoimune crónica com produção de anticorpos anti-TPO e anti-Tg).

O hipertiroidismo consiste na produção excessiva de T3 e T4 pela tiroide e pode ser devido a uma patologia neste órgão (diminuição de TSH), como no caso de Doença de Graves (doença autoimune com produção de anticorpos Trabs ativadores) ou a um problema secundário (TSH elevada ou normal). Um adenoma tóxico e um bócio multinodular tóxico podem ser também responsáveis por esta elevação de hormonas tiroideias. Lesões inflamatórias ou tumorais na tiroide podem elevar o nível de tiroglobulina.

### **Avaliação Gastrointestinal**

#### **a) *Helicobacter pylori***

A *H. pylori* é um bacilo de Gram-negativo responsável por úlceras gástricas e duodenais provocando uma reação inflamatória da mucosa que pode evoluir para carcinoma.

A pesquisa de infeção por esta bactéria pode se realizar através de serologia no aparelho Immulite 2000 (deteção de IgG e IgA), através da ureia marcada com Carbono-14 utilizando breathcards (teste consiste na análise do ar expirado após a ingestão de uma cápsula com carbono marcado, a ureia marcada é rapidamente hidrolisada pela urease da bactéria produzindo-se dióxido de carbono marcado que é detetado no aparelho Heliprobe) e através da pesquisa de antigénio desta bactéria nas fezes pelo um *kit* rápido de “lateral flow assay”.

### **b) Doença celíaca**

A doença celíaca caracteriza-se como uma enteropatia autoimune multifatorial proveniente da ingestão de uma proteína, o glúten (26). Nos doentes celíacos há produção de autoanticorpos contra a gliadina (péptido do glúten) e/ou transglutaminase (converte glutamina em ácido glutâmico) ocorrendo atrofia das vilosidades intestinais (menor absorção), hiperplasia das cristas e infiltração linfocitária. A presença de autoanticorpos anti-Transglutaminase IgA, anti-Transglutaminase IgG, anti-Gliadina IgA e anti-Gliadina IgG auxiliam no diagnóstico desta doença.

### **c) Calprotectina fecal**

A calprotectina é uma proteína existente no interior de leucócitos que, aquando patologias inflamatórias, que aumentam a permeabilidade da mucosa induzindo a migração de leucócitos para a corrente sanguínea, é libertada dos mesmos elevando-se a sua concentração no plasma. Deste modo, a calprotectina fecal, embora seja pouco específica, eleva-se nas fezes em patologias como Doença de Chron e Colite ulcerosa podendo auxiliar no diagnóstico das mesmas.

## **VIII. BIOLOGIA MOLECULAR**

No sector de Biologia Molecular realiza-se a pesquisa de RNA do vírus SARS-CoV-2 pela técnica de PCR assim como a deteção do antigénio HLA B27 que auxilia no diagnóstico de espondilite anquilosante.

## **IX. CONCLUSÃO**

O estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas foi essencial para completar a minha formação como técnica superior de diagnóstico e terapêutica uma vez que me permitiu visualizar e compreender vários processos analíticos de diversas áreas.

Com este estágio curricular no Labeto tive a oportunidade de adquirir competências tanto na fase pré-analítica e analítica como na pós-analítica.

O Labeto acompanha a crescente evolução das técnicas de análises clínicas através da aquisição de diversos aparelhos automatizados que permitem resultados mais rápidos, com menor erro associado e formação contínua qualificada dos técnicos envolvidos em todos os processos.

Esta excelente oportunidade concedeu-me uma evolução como pessoa e como profissional de saúde enriquecendo o meu conhecimento previamente aprendido nas aulas lecionadas ao longo do mestrado pelo que não poderia estar mais grata.

O presente relatório é o resultado de todo o trabalho e esforço desenvolvido ao longo de 6 meses de estágio no Labeto e a conclusão de um capítulo trabalhoso, árduo e emotivo mas que com a minha dedicação, persistência e resiliência me permite sentir realizada e completa.

## X. BIBLIOGRAFIA

- (1) NEOGI, Sohini S. [et al.]. - Pre-analytical phase in clinical chemistry laboratory. **Journal of Clinical and Scientific Research**. ISSN 2277-5706. 5:3 (2016) 171. doi: 10.15380/2277-5706.jcsr.15.062. [Acedido a 10 de dezembro de 2022]. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/>
- (2) BOWEN, Raffick A. R.; REMALEY, Alan T. - Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. **Biochemia Medica**. ISSN 13300962. 24:1 (2014) 31-44. doi: 10.11613/BM.2014.006. [Acedido a 10 de dezembro de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (3) MAHON, Connie; LEHMAN, Donald - **Textbook of diagnostic microbiology**. 6<sup>a</sup> Ed. Missouri: Elsevier, 2019. ISBN: 978-0-323-48218-9.
- (4) MURRAY, Patrick [et al.]. - **Medical microbiology**. 8<sup>ª</sup>Ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-323-29956-5.
- (5) SANTANA, T. [et al.]. - Perfil de resistência de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* isoladas de urocultura de comunidade do município de são luis-ma no período de 2005-2008. Revista de Patologia Tropical. ISSN 0301-0406. 41:3 (2012). doi: 10.5216/rpt.v41i3.20754. [Acedido a 10 de dezembro de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/><https://www.academia.edu/>
- (6) RIBEIRO, M. [et al.]. - Urinary infections in women: therapeutic and prophylactic actions. Brazilian Journal of Health Review. 4:6 (2021) 28217-28230. doi: 10.34119/bjhrv4n6-372. [Acedido a 30 de dezembro de 2022]. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/>
- (7) MASSON, Letícia Carrijo [et al.]. - Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o EAS. Revista Brasileira de Análises Clínicas. ISSN 2448-3877. 52:1 (2020). doi: 10.21877/2448-3877.202000861. [Acedido a 30 de dezembro de 2022]. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/>
- (8) LIMA, A. [et al.]. - **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 8<sup>a</sup> Ed. Brasil: Guanabara-Koogan, 2001. ISBN: 9788527706865
- (9) YOUNG, Graeme P. [et al.]. - Advances in Fecal Occult Blood Tests: The FIT Revolution. Digestive Diseases and Sciences. ISSN 15732568. 60:3 (2015) 609-622. doi: 10.1007/s10620-014-3445-3. [Acedido a 30 de dezembro de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (10) VISWANATHAN, V. K.; HODGES, K.; HECHT, G.- Enteric infection meets intestinal function: How bacterial pathogens cause diarrhoea. Nature Reviews Microbiology. ISSN

17401526. 7:2 (2009) 110-119. doi: 10.1038/nrmicro2053. [Acedido a 3 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (11) HAQUE, Rashidul - Human Intestinal Parasites. *J Health Popul Nutr.* (2007) 387-391. [Acedido a 3 de janeiro de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (12) RAABE, Vanessa N.; SHANE, Andi L. - Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiology Spectrum.* . ISSN 21650497. 7:2 (2019). doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0007-2018. [Acedido a 10 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (13) NESTER, Eugene; [et al] - **MICROBIOLOGY: A HUMAN PERSPECTIVE.** 7ª Ed. New York: McGraw-Hill, 2012 ISBN: 978-0-07-337531-1
- (14) MA, Bing; FORNEY, Larry J.; RAVEL, Jacques - Vaginal microbiome: Rethinking health and disease. *Annual Review of Microbiology.* ISSN 00664227. 66:2012 371-389. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150157. [Acedido a 15 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (15) HOFFBRAND, Victor; MOSS, Paul - **Hoffbrand's Essential Haematology.** 7ª Ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2016 ISBN: 978-1-118-40867-4
- (16) SANTOS, V. M. [et al]. - **Artigo de Revisão Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações.** [Acedido a 30 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/>
- (17) CAQUET, René - **Análises Clínicas: Guia Prático de Medicina.** Lisboa: Climepsi Editores, 2004 ISBN: 978-972-796-024-8
- (18) SKOOG, Douglas; HOLLER, F.; CROUCH, Stanley - **Principles of Instrumental Analysis.** 7ª Ed. Boston: Cengage Learning, 2018 ISBN: 978-1-305-57721-3
- (19) ROCHA, Fábio R. P.; TEIXEIRA, Leonardo S. G. - **ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DE SENSIBILIDADE EM ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.** [Acedido a 9 de março de 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/>
- (20) BURTIS, Carl; BRUNS, David - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** 7ª Ed. Missouri: Elsevier, 2018 ISBN: 978-1-455-74165-6
- (21) HARRIS, Daniel - **QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS.** 8ª Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2010 ISBN: 978-1-4292-1815-3
- (22) BIENVENU, Jacques. [et al.] - **Multicenter evaluation of the Paragon CZE TM 2000 capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing.** [Acedido a 30 de março de 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

- (23) LUSIS, Aldons- **Review articles: Atherosclerosis** [Acedido a 30 de março de 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (24) GAW, Allan. [et al.]- **Clinical Biochemistry: AN ILLUSTRATED COLOUR TEXT**. 5ª Ed. Missouri: Elsevier Ltd., 2013 ISBN: 978-0-7020-5179-1
- (25) COSTA, Sara. [et al.]- **Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família**. [Acedido a 30 de março de 2023]. Disponível em: <https://rpmgf.pt/>
- (26) NOBRE, Rito.; SILVA, T.; CABRAL, Pina- **DOENÇA CELÍACA REVISITADA**. [Acedido a 2 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/>