UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marlene de Jesus Cordeiro Rosário

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Maria José Rego de Sousa e pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Marlene de Jesus Cordeiro Rosário

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Maria José Rego de Sousa e pela Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

"Na vida, não existe nada a temer, mas a entender."
Marie Curie

Este trabalho foi desenvolvido graças a um estágio laboratorial em âmbito curricular no grupo Germano de Sousa, para efeitos de conclusão do Mestrado em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio teve lugar na sua sede e laboratório central de Lisboa.

GERMANO DE SOUSA
CENTRO DE MEDICINA LABORATORIAL

AGRADECIMENTOS

Com o fim de mais uma etapa que considero tão importante no meu percurso académico, não poderia deixar de agradecer aos que dele fizeram parte. Cada um à sua maneira, contribuíram para que os momentos mais difíceis desta caminhada fossem suplantados e que este tão aguardado dia chegasse.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e darem-me força na conquista de todos os meus sonhos e objetivos. Por serem sempre as pessoas-casa para onde volto.

Aos amigos que Coimbra me deu que, com a sua partilha e amizade, fizeram destes dois anos algo muito mais divertido e prazeroso. Um agradecimento especial ao Vítor Gonçalves.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, que proporcionou um excelente acolhimento e aprendizagem e na qual deposito total confiança na continuação da minha formação.

Ao laboratório Germano de Sousa, por me ter recebido da melhor forma, por todo o cuidado e atenção, à partilha de informação e auxílio incansável na sedimentação dos meus conhecimentos.

À Dra. Rita Ribeiro e ao Luís Sousa, por guiarem o meu estágio no laboratório da melhor forma e pela disponibilidade na conciliação das minhas necessidades aquando do mesmo.

À professora Dra. Maria José Rego de Sousa, pela orientação prestada neste relatório como orientadora externa.

À professora Dra. Sara Domingues, orientadora interna do relatório. Obrigada pela paciência e eterna dedicação que sempre me estendeu e que decerto proporcionou a melhor versão deste relatório.

RESUMO

O presente relatório de estágio tem como objetivo a descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular no âmbito da finalização do Mestrado em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio decorreu na sede e laboratório central do grupo Germano de Sousa em Lisboa ao longo de seis meses. A participação ativa na rotina laboratorial permitiu a consolidação dos conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do curso, nomeadamente no que concerne os procedimentos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, assim como os inerentes à avaliação do controlo de qualidade.

Primeiramente é realizada uma caracterização do laboratório, seguida de uma abordagem geral das valências analíticas da Imunologia e da Hematologia. Finalmente, as áreas da Bioquímica e da Microbiologia são descritas em maior profundidade e acompanhadas de casos clínicos, proporcionando uma maior integração dos conhecimentos.

O documento inclui o relato dos aspetos técnicos relacionados às atividades desenvolvidas assim como um foco na aplicação dos conhecimentos que permitam o diagnóstico e a monitorização das patologias através dos achados laboratoriais.

Palavras-chave: Análises clínicas, Atividade laboratorial, Bioquímica, Microbiologia, Germano de Sousa sede e laboratório central.

ABSTRACT

The aim of this internship report is to describe the activities developed during the curricular internship as part of the completion of the master's degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra.

The internship took place at the headquarters and central laboratory of the Germano de Sousa group in Lisbon over six months. Active participation in the laboratory routine allowed the consolidation of theoretical and practical knowledge acquired throughout the course, namely regarding pre-analytical, analytical and post-analytical procedures, as well as those inherent to the evaluation of quality control.

Firstly, a characterization of the laboratory is carried out, followed by a general approach to the analytical areas of Immunology and Hematology. Finally, the areas of Biochemistry and Microbiology are described in greater depth and accompanied by clinical cases, providing greater integration of knowledge.

The document includes a report on the technical aspects related to the performed activities, as well as a focus on knowledge application in order to diagnose and monitor various pathologies through laboratory findings.

Keywords: Clinical analysis, Laboratory activity, Biochemistry, Microbiology, Germano de Sousa headquarters and central laboratory.

µL	Microlitros
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BHI	Caldo cérebro-coração
CK	Creatina cinase
ClCr	Clearance da creatinina
CMI	Concentração mínima inibitória
CNA	Gelose de Columbia CNA + 5% de sangue de carneiro
COS	Gelose de Columbia + 5% de sangue de carneiro
CPSE	ChromID CPS elite
CQ	Controlo da Qualidade
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DCV	Doenças cardiovasculares
dL	Decilitro
EAM	Enfarte agudo do miocárdio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELFA	*Enzyme-linked fluorescent assay*
EUCAST	*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
GGT	Gama-glutamil transferase
Gr-	Gram negativo
Gr+	Gram positivo
GSSLC	Germano de Sousa Sede e Laboratório Central
HAEM	Gelose de Haemophilus 2
HbA1c	Hemoglobina glicada
HEKT	Gelose de Hektoen
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (sigla em inglês)
Ig	Imunoglobulina
INSA	Instituto Nacional Ricardo Jorge
IOM	*Input/Output Module*
ISE	*Ion-selective Electrodes*
L	Litro

LoQ	Limite de quantificação
MCK	Gelose de MacConkey
mg	Miligrama
mm	Milímetro
NAD	Nicotinamida adenina di-nucleótido
nm	Nanómetros
PNAEQ	Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade do Instituto Nacional Ricardo Jorge
PTGO	Prova de tolerância à glucose oral
PVX	Gelose de PolyViteX
PW	*Probe Wash*
QL	Qualitativo
Rpm	Rotações por minuto
RTT	*Reagent Turntable Tray*
SECQ	*Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*
SGC2	Gelose de Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol 2
sQT	Semi-quantitativo
T (°C)	Temperatura em graus Celsius
TFG	Taxa de filtração glomerular
TG	Triglicéridos
TODDH-T	Caldo Todd Hewitt + antibióticos
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
UFC	Unidades formadoras de colónia
UK- NEQAS	*United Kingdom National External Quality Assessment Service*
VF	Valores de referência
VS	Velocidade de Sedimentação

ÍNDICE

1. Introdução 1

2. O laboratório – Germano de Sousa Sede e Laboratório Central 2

2.1. Estrutura física e recursos humanos 2
2.2. Aspetos organizacionais e fluxo de trabalho 3
2.3. Segurança 6
2.4. Controlo da Qualidade 6
2.4.1. Calibrações 7
2.4.2. Controlo de Qualidade Interno 7
2.4.3. Avaliação Externa da Qualidade 8

3. Fase pré-analítica 9

3.1. Colheitas 11
3.1.1. Amostras colhidas pelos utentes 12
3.1.2. Amostras colhidas pelo técnico 13
3.2. Triagem 14

4. Imunologia 16

5. Hematologia 19

6. Bioquímica 21

6.1. ADVIA® Chemistry XPT 21
6.1.1. Ordem de trabalhos 24
6.1.2. Métodos 25
6.1.3. Parâmetros analíticos determinados 26
6.1.4. Validação analítica 27
6.2. Setor das Urinas tipo II – Exame sumário de urina 28
6.2.1. UNAMAX 29
6.2.2. SediMAX conTRUST PRO 30
6.2.3. Testes imunocromatográficos 31
6.3. Avaliação da função hepatobiliar 31
6.4. Avaliação da função renal e hidro-eletrolítica 32
6.5. Avaliação da função pancreática 33
6.6. Avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono 34
6.7. Avaliação do risco cardiovascular 35
6.8. Avaliação do metabolismo do ferro 36
6.9. Marcadores de inflamação e lise celular 37
6.10. Caso Clínico – Nimesulida como indutora de morte por insuficiência hepática aguda 38

7. Microbiologia 43

7.1. Exame microscópico 43
7.2. Meios de cultura 44

7.3. Identificação microbiana e testes de sensibilidade antimicrobiana 46
7.3.1. Provas complementares de diagnóstico 47
7.3.2. Métodos automatizados 48
7.3.2.1. Vitek® 2 XL 48
7.3.2.2. Vitek® MS 49
7.3.2.3. MicroScan WalkAway 96 Plus 50
7.3.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos – técnica manual 50
7.3.4. Testes imunocromatográficos 51
7.4. Marcha geral dos produtos biológicos 52
7.4.1. Urocultura 52
7.4.2. Exsudado vaginal 53
7.4.2.1. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* 54
7.5.3. Exsudado uretral 55
7.5.3.1. Pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* 56
7.5.4. Exsudados do trato respiratório superior 57
7.4.5. Expetoração, secreções e lavados brônquicos 59
7.5.6. Exames cutâneos 61
7.5.7. Coprocultura 62
7.5.8. Exame parasitológico de fezes 64
7.5.9. Hemocultura 65
7.5.10. Líquidos de cavidades serosas 66
7.6. Caso Clínico– *Streptococcus agalactiae*: sensibilidade na deteção 66
8. Conclusão 68
9. Bibliografia 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Código alfanumérico conferido às amostras pelo sistema informático no GSSLC. 4
Figura 2 – Fluxograma de trabalho no GSSLC. Cor azul assinala equipamentos com conexão à cadeia automatizada. Cor preta assinala encaminhamento manual pelos técnicos. 5
Figura 3 – Controlo qualidade interno da velocidade de sedimentação (setor da Hematologia). 7
Figura 4 – Avaliação Externa da Qualidade na secção da Bioquímica para o mês de fevereiro de 2023 (soro e urina). 8
Figura 5 –Cronograma da fase pré-analítica e suas principais características. 9
Figura 6 – Exemplo de procedimento manual na secção de Imunoserologia. 18
Figura 7 – Cuvetes para leitura espetrofotométrica no âmbito da prova da fragilidade osmótica. 20
Figura 8 – Registos fotográficos do equipamento ADVIA® Chemistry XPT. A – Vista superior e interface informático. B – Bandeja para colocação de controlo de qualidade interno e amostras manualmente pelo operador. C – Bandeja dos reagentes. D – Vista lateral com identificação do equipamento. 22
Figura 9 – Registo fotográfico da lâmpada de halogénio do ADVIA® Chemistry XPT aquando da sua substituição. 24
Figura 10 – Soluções consumíveis do ADVIA® Chemistry XPT. 24
Figura 11 – Controlos de qualidade internos dos ADVIA® Chemistry XPT. A – Níveis 1,2 e 3 de Multiqual. B – Níveis 1, 2 e 3 de Immunology. C – Níveis 1 e 2 para urina. D – Níveis 1 e 2 para microalbuminúria. E – Níveis 2 e 3 para marcadores cardíacos. 25
Figura 12 – UNAMAX (à direita) e SediMAX conTRUST PRO (à esquerda) conectados em cadeia. A. Menarini Diagnostics. 29
Figura 13 – Tiras teste LabUSticks 11F usadas para urianálise no UNAMAX. 29
Figura 14 – Controlo de qualidade interno da análise química e física à urina pelo UNAMAX. Nível normal (à esquerda), nível patológico (à direita). 30
Figura 15 – Imagens captadas pelo SediMAX conTRUST PRO a amostras de urina. Cursor com zoom dinâmico. A – Cristais de ácido úrico (agrupado em roseta); B – Cristais de oxalato de cálcio. C – Cristal de ácido úrico (romboide); D – Identificação pelo sistema de eritrócito e leucócito; E – Cristal de fosfato triplo. 30
Figura 16 – Teste imunocromatográfico para deteção qualitativa de drogas: cocaína, opióides e tetrahidrocanabinol. Teste positivo para consumo de cocaína e opióides. 31
Figura 17 – Visualização microscópica da prova da blastese. Presença de filamentação à direita e ausência à esquerda. 48
Figura 18 – Gelose cromogénea de Granada apresentando colónias laranja – identificação presuntiva de *Streptococcus agalactiae.* 55
Figura 19 - Galeria de identificação Mycoplasma IST2. Em cima, pesquisa negativa; em baixo, identificação presuntiva de *Mycoplasma hominis.* 56
Figura 20 – Zaragatoa orofaríngea semeada em gelose de CNA – identificação presuntiva de *Sreptococcus pyogenes.* 58
Figura 21 – Esfregaço em lâmina de amostra de expetoração denotando presença de bacilos corados de vermelho – bacilos ácido-álcool resistentes. 60
Figura 22 – Cultura em COS de lavado bronco-alveolar com presença de *Staphylococcus aureus* – β-hemólise. 60
Figura 23 – Coprocultura em HEKT apresentando colónias com centro negro, típico de *Salmonella* spp. 64
Figura 24 – Gelose seletiva de *Campylobacter* apresentando colónias vermelho-tijolo, típicas do género. 64
Figura 25 – Garrafas de hemocultura anaeróbia e aeróbia. 66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores que potencialmente possam conduzir a um erro pré-analítico no GSSLC. Adaptado de Najat[2]. 11
Tabela 2 – Materiais mais utilizados para colheita de amostras na rotina do GSSLC. 12
Tabela 3 – Meios de zaragatoa adequados para a colheita consoante critérios da amostra. 14
Tabela 4 – Equipamentos e metodologias realizadas no departamento de Imunologia. 17
Tabela 5 – Metodologias manuais realizadas no departamento de Imunoselorogia. 18
Tabela 6 – Equipamentos e metodologias do setor da Hematologia do GSSLC. 19
Tabela 7 – Distribuição dos níveis de CQI nos dias da semana. 25
Tabela 8 – Parâmetros analíticos determinados no ADVIA® Chemistry XPT, metodologias associadas à amostra de soro e valores de referência para o indivíduo adulto. 26
Tabela 9 – Resultados laboratoriais na admissão (0h) e às 18h de hospitalização. 39
Tabela 10 – Meios de cultura utilizados no GSSLC. 45
Tabela 11 – Cartas de identificação microbiana utilizadas no setor da Microbiologia. 49

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade que o Homem procura respostas diante das alterações fisiológicas com que se depara. Registos de indivíduos que urinavam frequentemente e cuja urina era doce, atraindo formigas, datam de centenas de anos a.C. Já no século XVII, a redescoberta do carácter doce da urina leva ao acrescento do sufixo latino *mellitus* à designação da condição como a conhecemos hoje, ou seja, denotando a urina ser "doce como o mel".

Ao longo dos últimos séculos a comunidade médica reconheceu as análises clínicas como uma ferramenta importante, ganhando espaços físicos e sendo incluída nos meios hospitalares. Mais tarde, o advento da tecnologia e automatização conferiu um avanço tremendo na rapidez e segurança na obtenção dos resultados, minimizando os erros e garantindo a sua qualidade. Em suma, elevando as análises como o complemento de excelência tantas vezes solicitado, tal como o é nos dias de hoje.

A formação teórica e prática transmitida ao longo dos dois anos do Mestrado em Análises Clínicas culmina agora na realização do estágio curricular, tendo em vista a profissionalização através da prática laboratorial e respetiva descrição.

O relatório de estágio tem como objetivo a exposição das atividades desenvolvidas no laboratório de análises onde o estágio decorre, assim como relatar a minha atividade no referido laboratório. Para este propósito, destaco os principais aspetos da minha experiência e aprendizagem tanto do ponto de vista técnico como da aplicação dos conhecimentos à clínica. Ademais, a integração na rotina laboratorial proporciona a obtenção de competências profissionais inerentes à prática laboratorial e que decerto perfazem uma vantagem para a entrada no mercado de trabalho.

O setor das análises clínicas é composto por profissionais de saúde qualificados e que desempenham um papel ativo na prevenção de doença, auxílio no diagnóstico, tratamento e monitorização patológica. Com esta finalidade, é importante o envolvimento do analista em equipas multidisciplinares através do estudo, aplicação e avaliação das metodologias analíticas adequadas, tanto para fins de diagnóstico como de rastreio.

Com efeito, o laboratório deve assegurar a garantia da qualidade de todos os resultados que produz, pois estes condicionam largamente as decisões clínicas. O sucesso da atividade laboratorial revê-se no contributo inestimável para a qualidade de vida das populações assim como na diminuição de futuros encargos em saúde.

2. O LABORATÓRIO – GERMANO DE SOUSA SEDE E LABORATÓRIO CENTRAL

A fundação do que é atualmente uma rede extensa de laboratórios remonta ao ano de 1975. Ao longo dos anos, teve um crescimento notável através de parcerias com hospitais e aquisição/inclusão de outros laboratórios no grupo. Nos dias de hoje, para além do laboratório de Patologia Clínica, vieram também outros juntar-se e reforçar a polivalência do grupo Germano de Sousa no setor da saúde: o laboratório de genética e genómica, o CEDAP – o laboratório de Anatomia Patológica, e o lançamento da Ophiomisc, uma *start up* para investigação cancerígena, testes preditivos e biopsias líquidas.

Primando pela inovação e modernização tecnológica, de equipamentos e procedimentos, e pela qualidade e rigor no seu dia-a-dia, consagra-se como um dos principais líderes de mercado atualmente, estando sempre a par da demanda crescente num setor que evolui vertiginosamente e no qual utentes e prescritores se apoiam. A gestão da qualidade, a melhoria contínua e a boa formação das equipas concorrem para que desenvolva de forma otimizada e rápida as suas atividades laboratoriais, acompanhando sempre a evolução e os desafios da medicina.

No ano de 2005 alcançou a certificação de qualidade pelas normas NP EN ISO 9001, em 2006 a certificação do núcleo de diagnóstico e rastreio pré-natal pela Fetal Medicine Foundation, em 2008 reconhecido como laboratório de excelência em Portugal com o Prémio 6 Sigma e em 2021 gratificado com o Prémio Marcas de Confiança pelo Reader's Digest.

A rede Germano de Sousa possui cerca de 550 postos de colheita espalhados por todo o país de Norte a Sul e nos Açores, realizando ainda, sob pedido, colheitas ao domicílio. Para além da sede em Lisboa onde decorre o estágio, possui mais 22 laboratórios analíticos e está presente em 12 hospitais. O grupo conta ainda com presença internacional, nomeadamente em Espanha, Angola e Quénia.

2.1. Estrutura física e recursos humanos

O Germano de Sousa Sede e Laboratório Central (GSSLC) divide-se em 2 edifícios. O edifício principal dispõe de uma área considerável, sendo constituído por 3 pisos. Os utentes dão entrada nas instalações através do piso 0 onde é realizada a sua admissão. Um espaço agradável, luminoso, amplo e central do edifício é utilizado como receção e respetiva sala de

espera. Lateralmente, a existência de salas proporciona o rápido encaminhamento dos utentes aos locais de colheita, dotados da devida privacidade.

Ainda neste piso, existe uma sala de descanso usada para provas mais demoradas em que idealmente o utente permanece nas instalações do laboratório, pelo que o espaço dispõe de conforto e privacidade adequados. Por fim, uma sala de conferências onde ocorrem os momentos de formação e reunião compõem a totalidade do piso.

O piso superior é composto pelos gabinetes da direção, biblioteca e salas dos patologistas, albergando também algumas valências laboratoriais. Aqui encontram-se os setores da Microbiologia, Auto-imunidade, Patologia Molecular e Imunoserologia.

Por fim, o piso inferior, o maior em termos espaciais, detém a maior parte dos equipamentos e a respetiva cadeia automatizada. Estão aí presentes os setores da Bioquímica, Imunologia, Hematologia, Triagem, Imunoalergologia, sala de lavagens e armazém. Da composição deste piso fazem parte ainda três áreas refrigeradas: de reagentes, de amostras a conservar e de congelamento a temperatura média de -20°C.

No edifício vizinho situam-se os setores da Citogenética, Genética Molecular e Pré-natal. Este edifício é conjunto com outras empresas pelo que todos estes setores enumerados se encontram no 2° piso, ocupando quase a sua totalidade.

A direção técnica do laboratório é assumida pelo Professor Dr. Germano de Sousa, a Professora Dra. Maria José Rego de Sousa pertence à administração do Grupo, sendo também responsável da Qualidade, o Dr. José Germano de Sousa é também administrador e a Dra. Rita Ribeiro é a técnica superior coordenadora do departamento técnico.

2.2. Aspetos organizacionais e fluxo de trabalho

A entrada das amostras no laboratório, provenientes quer das salas de colheita a este anexas, quer dos postos de colheita distribuídos um pouco por todo o país, é realizado no espaço da Triagem. Esta área está estrategicamente localizada no que toca ao "*work flow*" do laboratório, possuindo ligação diretamente para o exterior e assim otimizando a circulação dos estafetas e respetiva entrega das amostras.

Todas as amostras devem estar inequivocamente identificadas através de uma etiqueta autocolante. Nesta devem constar dados como o código de barras, tipo de produto para análise, data da colheita e nome completo do utente. Esta identificação é realizada aquando da colheita ao utente ainda nos postos de colheita (Figura 1).

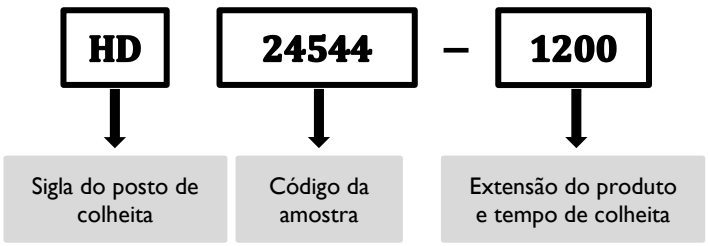


Figura 1 – Código alfanumérico conferido às amostras pelo sistema informático no GSSLC.

O registo da entrada das amostras em sede laboratorial e a comunicação com os equipamentos são realizados com recurso a uma ferramenta informática: o programa APPOLO. Neste programa ficam registados todos os processos aos quais as amostras são sujeitas: determinação de parâmetros analíticos, entrada e saída das várias secções e da cadeia automatizada, armazenamento e por último, eliminação. Todo este caminho percorrido pelas amostras é gravado de forma automática e sempre acompanhado do técnico responsável pela ação. Com efeito, é assegurada a rastreabilidade total das amostras em todos os processos que compõem a produção dos resultados laboratoriais. Ainda, o programa integra as informações do utente e o seu histórico analítico.

Uma característica flagrante do laboratório é o seu nível de automatização conseguido, em grande parte, pela aquisição da cadeia automatizada anteriormente referida. Nela podem entrar amostras de soro e urina e é também de salientar que nem todos os setores estão a ela conectados. Assim, posteriormente à chegada e à triagem das amostras de soro, a secção da Triagem é responsável por encaminhar os tubos de soro que reúnam os critérios adequados para a cadeia.

O processo de pipetagem é um processo maioritariamente realizado pelos equipamentos e, portanto, automático, pelo que é inerentemente influenciado por diversos fatores suscetíveis de impedir a análise. A presença de fibrina, formação de bolhas ou amostras de pequeno volume impossibilitam a análise através da cadeia automatizada, requerendo assim a intervenção manual dos técnicos.

A jornada levada a cabo pelas amostras na cadeia é definida através de um conjunto de prioridades e fluxos direcionais programados informaticamente (Figura 2). O facto de o processamento das amostras decorrer de forma automática e com uma intervenção manual diminuta, minimiza extensamente os riscos de contaminação das amostras e concorre para a segurança dos operadores.

O sector da Bioquímica é por definição o prioritário nas determinações analíticas. Tal deve-se a três grandes motivos: a grande percentagem de amostras com pedidos para este sector, a urgência inerente à determinação de alguns parâmetros caracterizados pela instabilidade destes ao fim de poucas horas e, por outro lado, à rapidez com que os resultados

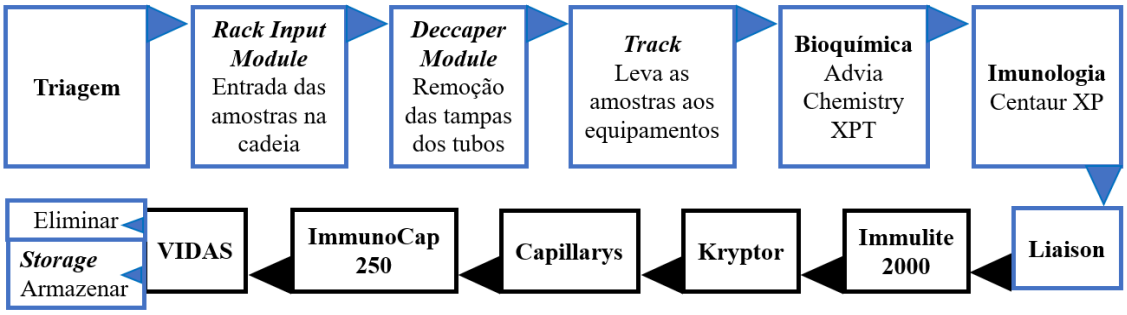


Figura 2 – Fluxograma de trabalho no GSSLC. Cor azul assinala equipamentos com conexão à cadeia automatizada. Cor preta assinala encaminhamento manual pelos técnicos.

são obtidos, estando a amostra rapidamente disponível para prosseguir às técnicas subsequentes.

Igualmente conectada à cadeia está o sector da Imunologia. As amostras são para aqui conduzidas após serem pipetadas nos equipamentos da Bioquímica, sendo de igual forma pipetadas e libertas para a circulação da cadeia comum. Contudo, os processos são mais demorados, levando a uma retenção das amostras mais prolongada.

Uma grande vantagem a considerar relativamente à cadeia automatizada é que terminada a pipetagem as amostras podem ser devolvidas à cadeia enquanto ainda decorre o método analítico no equipamento e, portanto, diminuindo o tempo que cada amostra permanece retida numa dada secção. Na eventualidade de alguma repetição ser necessária, um simples comando informático dado pelo técnico é o suficiente para que a amostra volte aos equipamentos através da cadeia e repita a análise.

Seguidamente, as amostras que possuam outros parâmetros a determinar dão continuidade ao processo analítico como exemplificado na Figura 2. As restantes são armazenadas no *storage*, uma unidade frigorífica acoplada à cadeia que arruma de forma automatizada as amostras de soro, registando inequivocamente a sua posição.

A cadeia automatizada possui ainda um componente crucial na rotina laboratorial: o *input/output module* (IOM). O IOM é um módulo de entrada e saída de amostras da cadeia automatizada e é útil em diversas situações. Este equipamento é dividido em 20 pontos de entrada e de saída, designados linhas, sendo que a maior parte é destinada à saída de amostras. A cada localização está perfeitamente associada uma característica ou um destino como são exemplos o erro na leitura dos códigos de barras das etiquetas, erros de pipetagem, entrada de tubos de urina ou, por outro lado, a necessidade do encaminhamento do tubo a uma dada secção que não está acoplada à cadeia.

A partir da primeira secção não conectada à cadeia automatizada, instruções de trabalho pré-estabelecidas definem a ordem pela qual as amostras devem passar pelas diferentes secções. Com efeito, uma maior organização e coordenação é essencial.

2.3. Segurança

Todo o pessoal colaborador que em qualquer ponto do desenvolvimento das suas atividades tenha contato com amostras, equipamentos e espaços associados circula obrigatoriamente com vestuário de proteção adequado. O uso entre calça e batina ou bata é opcional, sempre acompanhado do uso de luvas e demais equipamento, quando necessário. Os espaços são limpos várias vezes ao dia e os lixos separados consoante sejam resíduos não perigosos ou resíduos perigosos, com contentor verde para os resíduos de Nível III e contentor vermelho para os resíduos de Nível IV, que são recolhidos e devidamente tratados por empresa externa certificada.

2.4. Controlo da Qualidade

A gestão da qualidade laboratorial ou controlo da qualidade (CQ) é algo que está patente diariamente no laboratório e uma temática para a qual todos os colaboradores de alguma forma contribuem já que acompanham e avaliam o desempenho dos procedimentos e métodos de forma sistemática. Tendo como máxima o melhoramento contínuo, o rigor e a qualidade na entrega dos seus produtos – os resultados laboratoriais – o laboratório implementou um Sistema de Gestão da Qualidade em conformidade com a Norma EN ISO 9001:2015, que lhe conferiu a certificação.

Como laboratório certificado que é, está dotado de um Sistema de Garantia da Qualidade onde as atividades se encontram descritas e organizadas. Procedimentos escritos e instruções de trabalho estão disponíveis em papel e em formato eletrónico, disponível para consulta pelos colaboradores.

Os equipamentos, materiais e reagentes adquiridos são avaliados e certificados para os fins com que são utilizados. Orientações dos fornecedores são estritamente seguidas nomeadamente no que toca às manutenções periódicas a realizar pela marca, assim como assistências por avaria. Todos estes procedimentos ficam registados nos dossiers de qualidade dos equipamentos.

2.4.1. Calibrações

As calibrações das técnicas, contrariamente ao Controlo de Qualidade Interno (CQI), não são realizados rotineiramente. São antes ações a ter em momentos específicos e bem determinados:

∴ Mudança de lote dos reagentes;

∴ Calibração periódica indicada pelo fornecedor do equipamento/reagentes;

∴ Substituição de peças no equipamento;

∴ Após algumas das manutenções mais aprofundadas do equipamento;

∴ Falha no CQI não justificada.

2.4.2. Controlo de Qualidade Interno

O CQI é um conjunto de atividades, realizadas na rotina diária, que visam a obtenção de resultados laboratoriais fidedignos e que são transmitidos aos utentes e aos clínicos com toda a confiança[1].

Para atingir este fim, as técnicas são aferidas diariamente pelo CQI. Assim, os equipamentos realizam lavagens e CQI todas as manhãs antes da entrada de amostras para análise. Nalguns casos em que o volume de trabalho é maior, é executado um segundo CQI no mesmo dia. Desta forma, assegura-se que o equipamento continua a ter um desempenho eficaz durante toda a jornada de trabalho.

Figura 3 – Controlo qualidade interno da velocidade de sedimentação (setor da Hematologia).

Os CQI estão disponíveis em kits (Figura 3) que são adquiridos às casas comerciais cujo conteúdo pode ser líquido ou, mais frequentemente, pó liofilizado, requerendo a reconstituição antes do uso. A reconstituição dos CQI demanda então um cuidado especial visto que é uma ação manual e que consequentemente a sua qualidade depende da execução do operador. Alguns CQI controlam uma determinada técnica apenas, enquanto outros são multiparamétricos. Por norma, são compostos por dois a três níveis de concentração de entre baixo, normal e alto/patológico, variando entre as técnicas. Os CQI são passados todos os dias a pelo menos dois níveis de concentração, obrigatoriamente. Pelo que, se o kit for composto por três níveis de controlo, a conduta adotada é alternar os níveis controlados a

cada dia, estando deste modo estipulados quais os dois níveis de controlo a passar consoante o dia da semana.

Os CQI surgem como pontos numa carta de *Levey-Jennings* produzida automaticamente pelos equipamentos. Estas cartas revelam a distribuição dos valores dos CQI ao longo do tempo e se se mantêm dentro dos três desvios padrão aceitáveis em torno da média, ambos automaticamente calculados pelo equipamento e relativos a cada calibração. Da sua análise conseguimos perceber também tendências de erro e se poderemos estar diante de um potencial erro aleatório ou sistemático. Para este fim, o uso das regras de *Westgard* torna-se fundamental. Todos estes fatores integrados possibilitam um aumento da precisão dos resultados.

2.4.3. Avaliação Externa da Qualidade

Esta forma de avaliar o desempenho do laboratório tem como base o escrutínio dos resultados obtidos nas análises a materiais de controlo, devendo estes ser sujeitos às habituais condições e tratamento das amostras. As entidades, que fabricam e enviam estes materiais (Figura 4) e conhecem o seu conteúdo, comparam os valores obtidos pelo laboratório com os valores esperados, tratando estatisticamente a informação. O GSSLC participa em diversos programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) sendo eles:

- ∴ UK-NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*);
- ∴ SECQ (*Sociedad Española de Medicina de Laboratorio*);
- ∴ PNAEQ (Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade) do Instituto Nacional Ricardo Jorge (INSA).

Esta avaliação é da maior importância pois permite colocar laboratórios diferentes, mas que usam as mesmas metodologias/equipamentos, par a par. Logo, viabiliza-se uma comparação entre os mesmos com vista à harmonização de resultados, sempre em busca da qualidade e melhoria contínua. Todas estas vantagens que advém da participação nos programas de AEQ concorrem para um aumento e garantia da exatidão nos resultados laboratoriais.

Figura 4 – Avaliação Externa da Qualidade na secção da Bioquímica para o mês de fevereiro de 2023 (soro e urina).

3. FASE PRÉ-ANALÍTICA

A fase pré-analítica tem início muito antes das amostras chegarem ao laboratório. Desde a requisição médica até ao momento em que a amostra está apta para análise nos equipamentos, vários degraus devem ser suplantados com sucesso para que se atinja o objetivo final deste processo intricado e com tantos intervenientes – o bem-estar dos utentes. A Figura 5 caracteriza de forma esquematizada a cronologia da fase pré-analítica.

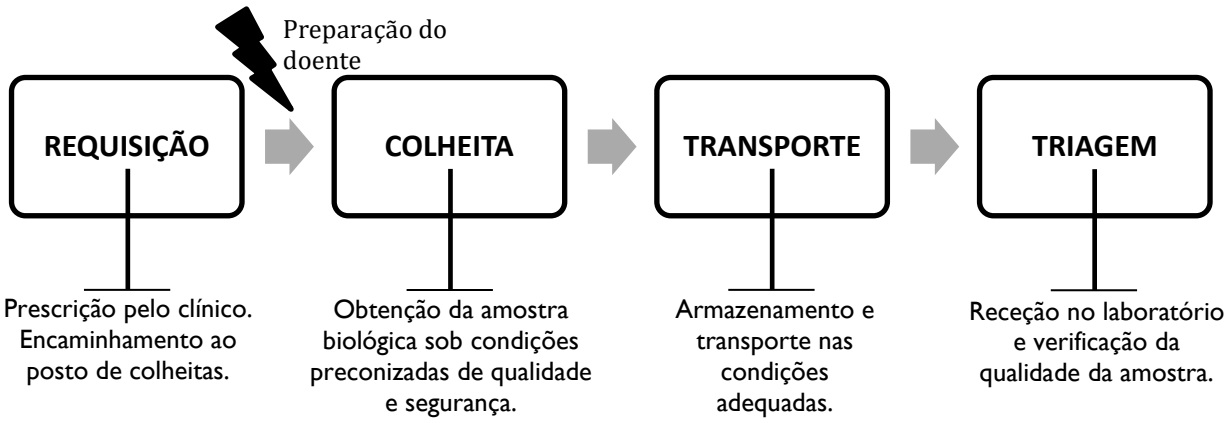


Figura 5 –Cronograma da fase pré-analítica e suas principais características.

Um dos fatores críticos é precisamente o primeiro passo desta caminhada dado em sede de consulta com o clínico. O uso de ferramentas indispensáveis como uma história clínica e um exame físico bem dirigidos irão condicionar a escolha correta do conjunto de parâmetros analíticos a investigar, ou seja, aqueles que darão as informações mais pertinentes para elucidar o estado de saúde ou de doença do utente.

No primeiro contacto do utente com o laboratório é da maior relevância que sejam comunicadas todas as informações consideradas essenciais para a preparação atempada das provas pelos utentes, assim como o fornecimento do material necessário e/ou ilustrativo para o efeito, sendo os panfletos informativos uma ótima ferramenta no caso de preparações complexas. Todavia, a comunicação verbal clara, simples e concisa é imprescindível nestes momentos.

Precisamente nesta fase da produção laboratorial é que se dá a maior percentagem de erros. Literatura recente demonstra que entre 46% a 68%[2], ou até mesmo 70%[3] da totalidade dos erros laboratoriais ocorrem na fase pré-analítica. Torna-se então fulcral que nesta fase se debruce toda a atenção pois, partindo de um erro poderemos certamente condicionar o resultado obtido à posteriori.

O erro pré-analítico pode ocorrer em vários momentos sendo eles aquando da preparação do utente, da colheita das amostras ou do seu transporte e acondicionamento até

à sede laboratorial. A implementação da norma EN ISO 15189 pode ser uma mais-valia importante para limitar o erro em terreno laboratorial. A Tabela I exemplifica detalhadamente os fatores mais comuns causadores de erro pré-analítico segundo Najat[2], devidamente adaptado ao contexto particular do GSSLC. Esta tabela reflete os erros passíveis de ocorrerem e aos quais os operadores deverão estar alerta. No entanto, nenhum estudo estatístico foi conduzido para aferir da sua frequência no laboratório, sendo meramente uma informação indicativa.

A qualidade da amostra irá ser o reflexo da qualidade da fase pré-analítica a que esteve sujeita. Todavia, existem características que inevitavelmente inserem variabilidade nas amostras obtidas, dividindo-se entre fontes de variabilidade biológicas e ambientais. Algumas destas variáveis podem ser controladas, no entanto outras são inerentemente imutáveis, como por exemplo a idade ou a raça.

Fatores como sexo, género, idade, raça, atividade física, se se trata de um fumador, os níveis de stress, o consumo de cafeína, medicamentos, drogas ou álcool são tudo considerações a refletir e que potencialmente alteram as concentrações de um determinado analito no organismo. Somam-se ainda variáveis como o clima, a altitude, o ritmo circadiano, a dieta adotada e níveis de hidratação, estado de gravidez ou fase do ciclo menstrual e postura durante a colheita.

Em resumo, muitas são as hipóteses encontradas passíveis de introduzir erro numa fase ainda anterior à análise *per se*. Com a finalidade de as atividades laboratoriais serem vistas como tendo qualidade, não poderão ser tidas como um "cavalo de Tróia" pela comunidade clínica, tal como aponta Lippi[4]. Este propósito é conseguido através da construção de valores de referência (VR) atendendo às variáveis demográficas de cada região e às suas populações, possibilitando a comparação do que é, na realidade, comparável.

Outro conceito importante é o de padronização dos procedimentos. Utentes sentados, tempos de garrotagem definidos, abstenção de exercício intenso nas 24h anteriores à colheita e cumprimento das 12h de jejum são exemplos de regras fundamentais a serem cumpridas, de um modo geral, para qualquer colheita de amostras de sangue venoso. Situações específicas deverão também contar com um conjunto de indicações de forma a uniformizar o processo de colheita e minimizar a introdução de variáveis de erro.

Tabela 1 - Fatores que potencialmente possam conduzir a um erro pré-analítico no GSSLC. Adaptado de Najat[2].

Erros pré-analíticos	Descrição
Requisição incorreta	Testes analíticos solicitados que não acrescentam valor.
Interpretação do pedido	Requisição erroneamente transcrita para base informática.
Orientação dos utentes	Comunicação inadequada levando a preparação incorreta para o exame.
Tempo de jejum	Certos parâmetros requerem 8 a 12h de jejum.
Capacidade dos utentes	Capacidade de concretização das tarefas para uma boa preparação.
Critérios aceitação	Verificação de condições prévias para aceitar/rejeitar amostras.
Falta de informação	Amostras recolhidas pelo utente. Indicação da medicação habitual.
Hora de colheita	Horários preconizados e registo da hora da colheita.
Ordem de colheita	Contaminação dos tubos com aditivos dos tubos anteriores.
Tubo incorreto	Colheita em tubo não adequado para a análise (aditivo incorreto).
Preenchimento de tubos	Volumes definidos em tubos com aditivos (respeitar proporções).
Inversão dos tubos	Critérios do modo de inversão e repouso para cada tubo.
Quantidade insuficiente	Quantidade de amostra obtida insuficiente para os testes requisitados.
Coágulos ou fibrina	Resultados erróneos. Entupimento das agulhas dos equipamentos.
Hemólise	Estase venosa prolongada. Flebotomia inadequada.
Lipémia	Turvação leitosa pela alta concentração de gordura no soro.
Identificação errónea	Contradição na identificação da amostra e formulário de requisição.
Troca de etiquetas	Re-etiquetagem e aliquotagem.
Perdas	Tubo partido na centrífuga, extravio do conteúdo (tampa mal fechada).
Contaminação	Amostra mal vedada, contentor aberto.
Atraso no transporte	Envio de amostras ultrapassa tempo ideal.
Conservação	Temperaturas adequadas, abrigo da luz, em ácido.
Reagentes expirados	Data de validade dos reagentes e materiais a uso ultrapassados.
Fluxo incorreto	Envio das amostras entre secções fora do fluxo predefinido.

3.1. Colheitas

As amostras mais comuns a darem entrada no laboratório são sangue venoso e urina: mais concretamente, tubos de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), tubos de soro com gel separador e contentores/boiões de urina. Contudo, uma grande variedade de material de amostragem é rececionada para análise, tal como retrata a Tabela 2.

No momento da colheita pelo técnico ou da entrega de amostras colhidas pelos utentes deve ser realizada a verificação dos dados pessoais do utente e dos parâmetros requisitados, assim como a recolha de informação pertinente para a interpretação dos resultados que se venham a obter.

Tabela 2 – Materiais mais utilizados para colheita de amostras na rotina do GSSLC.

Material de amostragem	Descrição e uso
	1 – Tubo seco. Sem aditivos. Gel separador. Ativação do coágulo pela sílica. Obtenção de soro.
	2 – Tubo de citrato de sódio. Anticoagulante. Obtenção de plasma.
	3 – Tubo de heparina de lítio. Anticoagulante. Obtenção de plasma.
	4 – Tubo de EDTA. Anticoagulante. Sangue total.
	5 – Contentor para urina das 24h.
	6 – Zaragatoa em meio de Amies/Stuart.
	7 – Zaragatoa sem meio (seca).
	8 – Zaragatoa uretral.
	9 - Zaragatoa Amies/Stuart com carvão.
	10 – Contentor seco para fezes.
	11 – Tubo para urina tipo II.
	12 – Tubo alíquota. Fundo cónico.
	13 – Tubo para colheita de saliva com rolo de algodão.

3.1.1. Amostras colhidas pelos utentes

Todos os espécimes colhidos pelos utentes, como urina, fezes, e expetorações, por exemplo, deverão chegar ao laboratório em recipientes descartáveis dotados para o efeito e bem vedados. Recipientes em mau estado que porventura possam ter estado suscetíveis a fenómenos de contaminação ou que, por outro lado, ponham em causa a segurança dos técnicos operadores, deverão ser inequivocamente rejeitados. Uma nova colheita deverá ser solicitada contemplando a informação necessária para o seu sucesso.

A maioria das amostras de urina analisadas são as da 1ª urina da manhã, mais precisamente urina assética. Como tal, são amostras colhidas pelos utentes. Este dado deve alertar imediatamente para a necessidade da verificação das condições em que a amostra terá sido colhida: urina do jato intermédio com limpeza genital prévia, neste caso. A amostra é posteriormente utilizada também para as análises de urinas tipo II.

A amostra de urina de 24h não são tão comuns, contemplando diariamente cerca de cinquenta pedidos a dar entrada no laboratório. Neste tipo de amostra, a colheita poderá tornar-se algo complexa e, como tal, deverá ser transmitida com toda a atenção. Escolhendo um horário de início da colheita, deve-se fazer o seu registo e esvaziar a bexiga uma última vez, desprezando o volume. A partir desse momento, o utente faz a colheita de todas as suas micções até ao mesmo horário do dia seguinte, devendo o utente urinar uma última vez quando perfazem as 24h e armazenar junto à restante amostragem, com o registo da hora. O recipiente contendo a urina das 24h, normalmente com 2 litros de capacidade, é então entregue ao laboratório. Durante o período da colheita o recipiente deverá ser mantido bem fechado e refrigerado.

As amostras de fezes são muitas vezes múltiplas e pedidas em dias separados, alternados, ou mesmo com um maior espaçamento durante um período de 10 dias – especialmente importante para a investigação parasitológica. Assim, dependendo do pedido clínico, a amostra terá as suas particularidades de colheita pelo que esta informação deve ser dada ao utente à priori e cuidadosamente verificada aquando da entrega dos recipientes.

Aquando da solicitação de colheita de expetoração, esta é comummente pedida no formato de 1ª amostra da manhã. Deste modo, chega ao laboratório em contentores fechados, devendo estes ser verificados quanto à qualidade da amostra. Amostras com qualidade são compostas pelo produto mucoso da expetoração, na ausência de saliva.

3.1.2. Amostras colhidas pelo técnico

A colheita de sangue venoso é realizada nas salas de colheita pelo técnico flebotomista. A implementação de boas práticas nesta fase é crucial para a obtenção de uma amostra de qualidade, evitando introduzir uma fonte de erro nos resultados que se venham a obter.

A ordem pela qual a colheita de sangue venoso é efetuada deve ser respeitada com o objetivo de se evitarem contaminações com os aditivos presentes nos tubos. A hemocultura surge em primeiro lugar de modo a evitar contaminações microbiológicas da amostra que, a princípio, é fisiologicamente estéril. A ordem de colheita preconizada no Manual das Boas

Práticas Laboratoriais e no Manual de Colheitas é a seguinte: hemoculturas, tubo seco de soro, tubo de citrato, tubo de heparina e tubo de EDTA.

O volume de sangue a colher para os tubos com anticoagulantes, representado por uma marca guia nas suas etiquetas, deve ser respeitado. Após a colheita de sangue para os tubos necessários procede-se à sua homogeneização por inversão múltipla e suave. Estas duas ações são terminantes para o sucesso do restante processamento laboratorial.

Por um lado, o volume de anticoagulante presente em cada tubo está definido para um dado volume de sangue a colher, de forma a obter o ratio correto. Por outro, apenas a homogeneização imediata após a colheita garante que todo o anticoagulante é perfeitamente misturado com o sangue, e assim evitando a formação de coágulos sob um efeito anticoagulante efetivo e que se mantém no tempo. No caso da obtenção de plasma nos tubos de citrato e heparina, estes devem ser centrifugados por 15 min a 3000 rpm.

A colheita para obtenção de soro é realizada em tubo seco sem aditivos. A sílica presente na superfície interna dos tubos é o agente promotor da ativação da cascata da coagulação aquando do contacto do sangue com as paredes. Deve-se aguardar o tempo da formação do coágulo, tipicamente entre 15 e 30 min, para a amostra estar então apta para a centrifugação por 15 min a 3500 rpm. O gel separador migra e, por diferenças de densidade, cria uma barreira entre o soro, que se situa superiormente, e o coágulo, material celular e fatores de coagulação, abaixo.

Amostras de tecidos ou que fazem uso de zaragatoa (Tabela 3) são colhidas em meio laboratorial, quer nos postos de colheita, quer nos hospitais associados, sendo depois devidamente armazenados e encaminhados ao laboratório.

Tabela 3 – Meios de zaragatoa adequados para a colheita consoante critérios da amostra.

<table>
<tr><th>Stuart/Amies</th><th>Seca</th><th>Stuart/Amies com carvão</th></tr>
<tr><td rowspan="3">Exsudado nasal, orofaríngeo, auricular, ocular e de feridas</td><td>Pha Direto</td><td rowspan="3">Pesquisa de Neisseria gonorrhoeae em qualquer amostra</td></tr>
<tr><td>Pesquisa de eosinófilos</td></tr>
<tr><td>Exsudados para Patologia Molecular</td></tr>
</table>

3.2. Triagem

A função da triagem de todas as amostras que dão entrada no laboratório reveste-se da maior importância para o sucesso do trabalho laboratorial como um todo. Aqui são

rececionados todo o tipo de materiais e é definido o processamento adequado a cada um deles como sendo: sangue total, soro, plasma, urina, fezes, placas de petri já semeadas, zaragatoas de exsudados vaginais, anais, uretrais, nasofaríngeos, orofaríngeos e de tecidos purulentos, parasitas isolados previamente, tecidos variados, lâminas para observação ao microscópio e testes que recorrem ao ar expirado.

À chegada, é verificada a temperatura das amostras, sendo que estas podem estar congeladas, refrigeradas ou à temperatura ambiente. Às amostras identificadas como urgentes é dado um seguimento mais célere para que possam ser analisadas o mais rapidamente possível. Por norma, as urinas das 24h chegam ao laboratório já separadas pelos postos de colheita em tubos de alíquota, tendo os recipientes sido previamente bem homogeneizados. Assim sendo, o tubo deverá ser forçosamente acompanhado pelo registo do volume total das micções. A Triagem verifica a concordância entre a inscrição do volume na etiqueta dos tubos e o registo em sistema informático.

Procede-se então à separação das amostras tendo como critério o tecido em causa, em recipiente devidamente identificado. A correta identificação das amostras é verificada, devendo ser inequívoca pois, caso a informação não seja clara ou esteja ausente, a amostra é desprezada, devendo o utente ser de seguida notificado da necessidade de repetição.

Um aspeto muito importante na triagem das amostras, especificamente das de soro, é a verificação de que foram centrifugadas eficazmente. Após a colheita de sangue, dever-se-á aguardar o tempo de retração do coágulo e só posteriormente se procede à centrifugação. Amostras colhidas à escassos momentos nas salas anexas ao laboratório ou de postos próximos poderão chegar sem terem sido centrifugadas, pelo que dever-se-á proceder à centrifugação das mesmas.

Amostras centrifugadas devem ser também triadas de modo a assegurar que possuam todos os critérios adequados para prosseguirem para a fase analítica, tais como ausência de fibrina, correta separação das células e do soro sobrenadante pelo gel e quantidade suficiente para análise de todos os parâmetros requisitados.

4. IMUNOLOGIA

A secção de Imunologia situa-se no piso inferior do edifício central do laboratório e é bastante automatizada, estando conectada à cadeia automática. Vários técnicos constituem a equipa cujo coordenador é o técnico superior Luís Sousa. A validação biopatológica é levada a cabo por uma equipa de médicos. Devido ao volume de trabalho considerável a secção opera 24 horas por dia num contínuo apenas quebrado pelas manutenções diárias dos equipamentos.

O fundamento base das técnicas empregues nesta secção é a determinação de parâmetros analíticos quantitativos e qualitativos dotados de importância biológica e com base na deteção da ligação entre um antigénio e um anticorpo[5]. Assim, os imunoensaios surgem como métodos que tiram partido da seletividade e da especificidade dessa ligação.

Alguns dos marcadores mais úteis no diagnóstico e acompanhamento dos doentes são determinados neste setor: quantificação de hormonas tireoideias, reprodutivas e marcadores tumorais, de lesão cardíaca e de doenças infectocontagiosas são exemplos bem patentes na sua atividade laboratorial diária.

Dois formatos de imunoensaios são maioritariamente usados:

∴ Imunoensaio em sanduíche: mistura reacional contendo dois tipos diferentes de anticorpos com especificidade para um mesmo antigénio/analito, porém para haptenos diversos, ligando-se em regiões distintas. Ocorre em 2 etapas onde normalmente o 1° anticorpo é marcado, por exemplo, com estreptavidina, que se liga ao antigénio, seguindo-se a adição do 2° anticorpo ligado a uma fase sólida, como é o caso comum das partículas paramagnéticas. O complexo forma como que uma sanduíche e a emissão de sinal, luz ou fluorescência, é medido e será proporcional à quantidade de analito presente na amostra.

∴ Imunoensaio competitivo: reagente contendo um anticorpo específico para o analito a pesquisar e que está ligado a uma fase sólida. Numa 2ª etapa a adição de um antigénio marcado compete com o antigénio da amostra pelos locais de ligação do anticorpo. Quanto mais antigénios na amostra, menos os que estão marcados (do reagente) se ligam, pelo que o sinal detetado é inversamente proporcional à quantidade de analito (a partícula marcada pode tanto ser o antigénio como o anticorpo).

Além da secção-mãe de Imunologia, as secções da Imunoalergologia e da Imunoserologia complementam os estudos que têm como base o fundamento da ligação

antigénio-anticorpo. A Tabela 4 tem como objetivo elucidar da melhor forma os parâmetros analíticos e as técnicas utilizadas pelos vários equipamentos existentes.

Tabela 4 – Equipamentos e metodologias realizadas no departamento de Imunologia.

	Equipamento e Metodologia		Parâmetro analítico
IMUNOLOGIA	**ADVIA Centaur® XP Siemens** Quimioluminescência (direta e indireta)	Imunoensaio competitivo	T3, FT3, T4, FT4, VB12, COR, eE2, FOL, TSTII, Ac. para Hepatite B
		Imunoensaio sanduíche	AFP, CEA, CA-125, CA15-3, CA19-9, Ag+Ac HIV, PSA, FSH, FER, LH, hCG, PRL, TRG, TSH, Ac. e Ag. HBV e HCV
		Imunoensaio de captura de anticorpo	Ac. total e IgM HAV
	Immulite® 2000 XPi Siemens Quimioluminescência	Imunoensaio enzimático em fase sólida	Eritropoietina, IGF-1, ACTH, Hormona de crescimento, Delta-4-androstenionona, anti-tireoglobulina
IMUNO SEROLOGIA	**VIDAS® 3 BioMérieux** Fluoroenzimático	Imunoensaio sandwich	Pro-BNP, Mioglobina, Troponina I, D-dímeros, CK-MB (massa). Confirmação de HBV, HCV, HIV, e de IgM e IgG para Rubéola, Toxoplasma, Citomegalovírus e EBV
	Cobas e 411 Roche Quimioluminescência	Imunoensaio sanduíche	Cortisol salivar, Marcadores tumorais como o CYFRA
IMUNO ALERGOLOGIA	**Liaison® XL DiaSorin** Quimioluminescência	Imunoensaio "flash" em fase sólida	IgM e IgG para toxoplasma, CMV, EBV, rubéola, e avidez destas IgG; vitamina D, renina.
	Phadia™ 250 Thermo Fisher Scientific	Imunoensaio em fase sólida	IgE total e específicas, IgG (cerca de 700 alergénios)

T3= Triiodotironina; FT3= Triiodotironina livre; T4= Tetraiodotironina; FT4= Tetraiodotironina livre; COR=Cortisol; eE2= Estradiol; FOL= Folato; TSTII= Testosterona total; Ac.= anticorpo; AFP= alfa-fetoproteína; CEA= Antigénio carcinoembrionário; Ag.= Antigénio; PSA= Antigénio específico da próstata; FSH= Hormona folículo-estimulante; LH= Hormona luteinizante; hCG= Gonadotrofina coriónica humana; PRL= Prolactina; TRG= Tireoglobulina; TSH= Hormona estimulante da tiroide; Ig= Imunoglobulina; IGF-1= Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1; ACTH= Hormona corticotrófica; BNP= Péptido Natriurético Cerebral; HAV= Hepatite A; HBV= Hepatite B; HCV= Hepatite C; HIV= Vírus da Imunodeficiência Humana; CK-MB= isoenzima MB da Creatina cinase; EBV=Vírus Epstein-Barr; CMV= Citamegalovírus

Durante o estágio pude observar e participar ativamente na manutenção e preparação dos equipamentos para as atividades diárias, realização de calibrações e CQI, inserção de amostras em *racks* no equipamento manualmente, execução das técnicas manuais, pesquisa e inserção de informação no sistema informático e validação técnica.

A amostra mais utilizada é o soro, sendo que a maior parte das metodologias se concentram nos ADVIA Centaur®. Menos frequentemente, alguns parâmetros são realizados no plasma como é estipulado para os D-Dímeros, ou mesmo na urina e saliva, como são exemplos o cortisol urinário e cortisol salivar.

O setor da Imunoserologia contempla as técnicas manuais de pesquisa de anticorpos ou antigénios no soro (Tabela 5), testes estes que auxiliam no diagnóstico de algumas doenças infeciosas. Para isto dispõe de kits comerciais que contêm os reagentes, controlos e bulas

necessários para a execução dos ensaios. Devido à manipulação do operador inerente a estes procedimentos é de extrema importância a definição de um método de trabalho organizado e eficaz que concorra duplamente para a minimização do erro humano e para o tratamento das amostras em tempo útil.

Tabela 5 – Metodologias manuais realizadas no departamento de Imunoselorogia.

Metodologia	Método	Resultado	Diagnóstico sugestivo
VDRL/PRP	Floculação	QL/sQT	Sífilis
TPHA	Micro-aglutinação	QL/sQT	Sífilis
RA teste (Waaler Rose)	Aglutinação	QL/sQT	Artrite Reumatóide
Reação de Paul-Bunnel	Aglutinação	QL/sQT	Mononucleose Infeciosa
Reação de Rosa Bengala	Aglutinação	QL/sQT	*Brucella* spp.
Reação de Widal	Aglutinação	QL/sQT	*Salmonella* spp.
Influenza A+B	Imunocromatográfico	QL	Vírus Influenza A e B
Vírus Zika IgG/IgM	Imunocromatográfico	QL	Vírus Zika
Reação de Weil-Felix Proteus OxK/Ox2/Ox19	Aglutinação	QL/sQL	Rickettsiae spp.
Sangue oculto nas fezes	Imunocromatográfico	QL	Presença de hemoglobina Sangramento trato intestinal
Blot HCV	Imunoblot	QL	Hepatite C
Blot HIV	Imunoblot	QL	Vírus da Imunodeficiência Humana

QL= Qualitativo; sQT= Semi-quantitativo

A aglutinação é o método mais frequentemente encontrado nestas técnicas manuais (Figura 6) e, para todos os casos neste estágio, é possível realizar não só a determinação qualitativa (QL), mas também a obtenção de títulos de infeção, possibilitando um resultado semi-quantitativo (sQT).

O VIDAS® 3 BioMérieux está igualmente sobre a alçada da Imunoserologia, sendo que este equipamento é utilizado pelas restantes secções da Imunologia quando é necessário um teste confirmatório de alguns parâmetros pré-definidos.

Figura 6 – Exemplo de procedimento manual na secção de Imunoserologia.
Técnica do VDRL: poço 6 e 8 positivos, poço 7 negativo.

5. HEMATOLOGIA

Este setor é coordenado pela técnica superior Estela Martins e localiza-se no piso inferior do edifício central em duas salas segregadas, pelo que não está conectado à cadeia automatizada. Uma equipa de médicos e farmacêuticos especialistas asseguram a validação biopatológica dos resultados laboratoriais. O volume de trabalho é considerável pois a requisição do hemograma é quase transversal nos pedidos laboratoriais.

As atividades laboratoriais da secção visam o estudo das células sanguíneas e das propriedades deste tecido, englobando parâmetros obtidos de forma automatizada, semi-automatizada (Tabela 6) e por meio de técnicas manuais.

Tabela 6 – Equipamentos e metodologias do setor da Hematologia do GSSLC.

Equipamento	Metodologia	Parâmetro analítico	Amostra
XN-9100™-401 Sysmex	**4 módulos XN-10** Citometria de fluxo fluorescente Impedância com foco hidrodinâmico Sulfato laurel de sódio, livre de cianeto	Hemograma com plaquetas Fórmula leucocitária Reticulócitos	Sangue total em tubo de EDTA
	1 módulo DI-60 Tecnologia automatizada e padronizada	Solução integrada de preparação e coloração de lâminas e análise digital da morfologia celular	Sangue total em tubo de EDTA
Hb NEXT A. Menarini Diagnostic	HPLC de troca catiónica de fase reversa	HbA1c	Sangue total em tubo de EDTA
CS-5100 Sysmex	Turbidimetria Método cromogéneo	Perfil de coagulação	Plasma em tubo de citrato de sódio
Ves-Matic Cube 30 Touch A. Menarini Diagnostics	Método de *Westergren* modificado	VS	Sangue total em tubo de EDTA

HPLC= Cromatografia líquida de alta performance; HbA1c= Hemoglobina glicada; VS= Velocidade de sedimentação; EDTA= ácido etilenodiamino tetra-acético.

O estágio na Hematologia permitiu um contato estreito com esta área laboratorial na medida em que pude participar na preparação diária dos equipamentos, calibrações e CQI, carregamento de amostras para análise nos equipamentos automatizados e semi-automatizados, execução de técnicas manuais e colorações, validação analítica e procedimentos de armazenamento e eliminação de amostras.

O hemograma, contagem de plaquetas e reticulócitos, leucograma e execução de lâminas de esfregaço de sangue periférico são realizados por um sistema modular de cinco equipamentos dispostos lado a lado, partilhando uma cadeia comum que os conecta[6]. No XN-9100™ os ensaios decorrem da pipetagem do mesmo tubo de EDTA.

A determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) é executada pelos quatro equipamentos Hb NEXT a partir do tubo de EDTA. A medição da HbA1c em amostras com pouca quantidade decorre após um passo de diluição que antecede o ensaio, realizado com diluente apropriado e fornecido pela casa comercial.

A velocidade de sedimentação (VS) é determinada no Ves-Matic Cube 30 Touch ou na sua versão anterior, o Ves-Matic Cube 30 através de método perfeitamente correlacionado com o método de referência de *Westergren*. Todavia, amostras com uma quantidade menor de volume, amostras cujo resultado no equipamento é >50 e em que o utente tem diagnóstico de gamapatia monoclonal conhecido são analisadas com recurso a procedimento manual. Neste, a VS é determinada por visualização da marca superior da camada formada pela sedimentação das hemácias em tubo graduado, ao fim de 1 hora.

O perfil de coagulação é realizado no CS-5100 onde a amostra indicada para o efeito é o plasma anticoagulado com citrato de sódio. As determinações efetuadas diariamente são: tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), fibrinogénio, razão Normalizada Internacional (INR) e tempo de trombina. Alguns parâmetros são analisados duas vezes por semana devido à sua especificidade e menor volume de requisição: proteína C e fator VIII da cascata da coagulação.

As técnicas manuais mais frequentemente realizadas na Hematologia são:

∴ Pesquisa de células LE, útil no diagnóstico de Lupus Eritematoso. Amostra de soro pelo método de aglutinação.

∴ Titulação de crioaglutininas, habitualmente auto-anticorpos imunoglobulina (Ig) M contra o antigénio I das hemácias, num fenómeno desencadeado a baixas temperaturas (<37°C) levando a uma potencial anemia hemolítica auto-imune. Amostra de soro colhido e transportado a quente pelo método de aglutinação.

∴ Prova de fragilidade osmótica dos eritrócitos, concentrações crescentes de NaCl de modo a fragilizar a membrana dos eritrócitos levando à hemólise e libertação da hemoglobina. Determinação por espetrofotometria – transmitância a 540nm, de 50% de hemólise (Figura 7). Amostra de sangue total em heparina de lítio.

∴ Alguns dos esfregaços de sangue periférico e medula óssea e respetiva coloração com May Grünwald Giemsa (MGG) e Perls;

∴ Prova de falsiformação experimental. Sangue total colhido em heparina de lítio.

Figura 7 – Cuvetes para leitura espetrofotométrica no âmbito da prova da fragilidade osmótica.

6. BIOQUÍMICA

O departamento da Bioquímica é coordenado pelo técnico superior Luís Sousa e a validação biopatológica dos boletins é realizada por uma equipa de médicos. Devido ao número elevado de amostras a analisar a secção funciona quase 24h, suspendendo os processos analíticos apenas para dar lugar às manutenções diárias preconizadas.

A secção é altamente automatizada pois está ligada à cadeia de distribuição dos tubos. Além das raras exceções onde é necessária uma intervenção manual do operador, as amostras circulam e são analisadas de forma automatizada. Os equipamentos da Bioquímica estão definidos como prioritários no fluxo de trabalho programado eletronicamente pelo que é o primeiro local para onde a *track* encaminha as amostras.

No decorrer do estágio tive oportunidade de preparar os equipamentos para o dia de trabalho repondo as soluções reagentes e auxiliares, reconstituindo as soluções que assim o exigissem e realizando as calibrações necessárias e CQI para todos os parâmetros. Pude também participar ativamente na fase analítica através da colocação manual de amostras nos equipamentos e da realização de alíquotas e de diluições manuais. Por fim, foram-me transmitidas todas as ferramentas para melhor compreender a validação técnica pelo que também tive a oportunidade de a realizar com a devida supervisão.

A Bioquímica estuda as moléculas e as reações químicas com importância biológica e com o objetivo de melhor entender o metabolismo dos seres vivos, tão importante para o seu bem-estar e, no limite, para a sua sobrevivência. Com efeito, assenta na pesquisa de marcadores metabólicos e reflete acerca das suas alterações, quer fisiológicas, quer reveladoras de um estado patológico[7]. A fim de obter um diagnóstico ou de fazer a monitorização dos doentes, emprega os VR apropriados a cada indivíduo[8]. As amostras mais utilizadas para tal são o soro e a urina.

6.1. ADVIA® Chemistry XPT

Os procedimentos laboratoriais da Bioquímica são realizados praticamente na sua totalidade nos dois ADVIA® Chemistry XPT que a secção possui (Figura 8). Apesar de os ensaios serem realizados num curto espaço de tempo, a duplicidade dos equipamentos é justificada pela elevada afluência de amostras neste departamento.

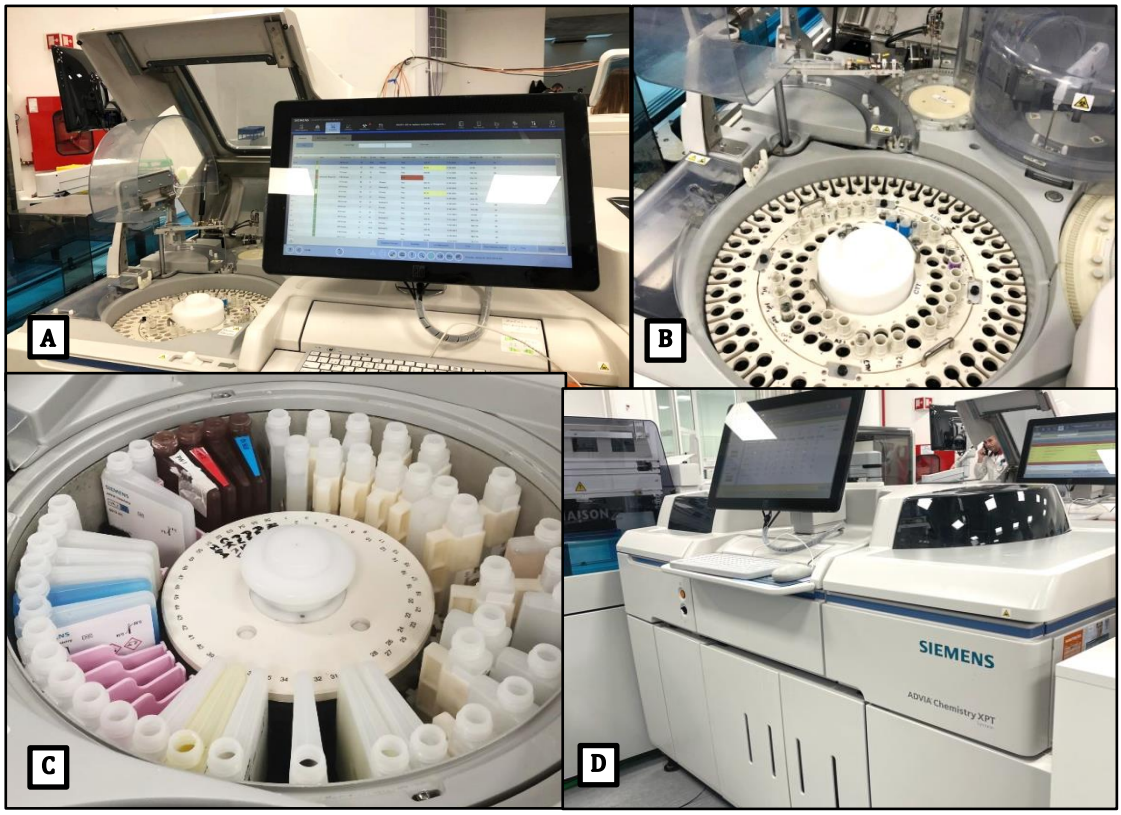


Figura 8 – Registos fotográficos do equipamento ADVIA® Chemistry XPT. A – Vista superior e interface informático. B – Bandeja para colocação de controlo de qualidade interno e amostras manualmente pelo operador. C – Bandeja dos reagentes. D – Vista lateral com identificação do equipamento.

O ADVIA® Chemistry XPT[9] é um analisador de química clínica concebido para ser altamente automatizado, operado em contínuo e utilizado em laboratórios de elevada demanda. Assim, apresenta um rendimento de mais de dois milhares de ensaios por hora e dispõe de conectividade instantânea, sendo os resultados prontamente transmitidos para o APPOLO. Ademais, a sua produtividade resulta da implementação de um conjunto de tecnologias avançadas que permitem a célere obtenção de resultados e um fluxo de trabalho melhorado. Estes fatores, no seu conjunto, encurtam o chamado "*turnaround time*" para cada amostra.

A capacidade de trabalhar com volumes micro através de uma pipetagem eficaz e limpa permite que sejam utilizados volumes ínfimos de amostra para a realização dos ensaios, concomitantemente com um menor desperdício de reagentes. O uso mais eficiente da amostra toma relevância nos casos de amostras colhidas a crianças ou resultantes de colheitas difíceis, em que o volume disponível para análise é diminuto, ou ainda no caso de pedidos de análises extensos.

Outra das tecnologias de grande utilidade que o equipamento possui é a retenção das alíquotas que executa até que os resultados estejam disponíveis. Isto é, quando o equipamento pipeta uma amostra, a alíquota resultante mantém-se a bordo do equipamento caso sejam

necessárias novas ações como sendo repetições ou diluições automáticas, enquanto a amostra é libertada para a cadeia automatizada, dando continuação ao *workflow* analítico.

Consequentemente, a validação técnica das amostras flui de forma mais harmoniosa já que o próprio equipamento deteta erros e limitações nos ensaios e comanda a sua repetição, quer por falha no processo de pipetagem, presença de bolhas ou fibrina, quer quando o analito ultrapassa o limite de quantificação (LoQ) superior do ensaio e seja necessária uma repetição com recurso a diluição. Os novos *inputs* relacionados com estes fatores e transmitidos às alíquotas a bordo do equipamento tomam sempre prioridade em relação à chegada de novos tubos pela cadeia.

O equipamento é composto por três bandejas incrustadas destinadas a serem manipuladas e repostas manualmente pelo operador. Os CQI, calibradores e seus diluentes localizam-se em posições predefinidas e dotadas de refrigeração (6 – 13°C), mantendo os CQI nas melhores condições de estabilidade ao longo do dia, viáveis para utilização num 2° momento de CQI diário. Na inserção manual de amostras, o tubo deve ser colocado de forma que o código de barras fique voltado para o exterior onde a sua leitura possa ser executada pelo leitor de infravermelhos embutido e através da rotação da bandeja.

As outras duas bandejas que fazem parte da constituição do equipamento albergam os reagentes necessários para as reações químicas. Em ensaios que decorrem apenas com 1 reagente, este é colocado na bandeja número 1, designada por *Reagent Turntable Tray* (RTT) 1, enquanto as técnicas que ocorrem pela ação de 2 reagentes têm o primeiro reagente na bandeja RTT1 e o reagente secundário na RTT2, sendo ambas as localizações refrigeradas. A existência de um leitor de códigos de barra permite a identificação dos reagentes, pelo que podem gozar de qualquer posição na bandeja.

O prato reacional do equipamento onde se dão as reações químicas úteis na quantificação dos analitos encontra-se mergulhado inferiormente num banho reacional, possibilitando que as reações ocorram à temperatura ideal de 37°C. O ionograma, mais precisamente a determinação do potássio, sódio e cloreto, está segregado à esquerda dos restantes componentes a bordo e é realizado por elétrodos seletivos de iões (ISE).

O ADVIA® Chemistry XPT verifica qualitativamente parâmetros como a hemólise, lipémia e icterícia das amostras sendo crucial para uma avaliação objetiva destes critérios. Com efeito, a validação analítica faz uso destas determinações, auxiliando na valorização dos achados bioquímicos.

As tecnologias empregues nos procedimentos são a potenciometria, a fotometria e a turbidimetria. O fotómetro trabalha em 14 comprimentos de onda fixos entre 340nm e 884nm, fornecidos por lâmpada de halogénio (Figura 9).

A visualização das curvas de calibração e dos resultados do CQI podem ser realizadas diretamente no monitor do equipamento, assim como os respetivos gráficos de *Levey-Jennings*.

Figura 9 – Registo fotográfico da lâmpada de halogénio do ADVIA® Chemistry XPT aquando da sua substituição.

6.1.1. Ordem de trabalhos

Na parte inferior do equipamento estão localizadas soluções consumíveis (Figura 10) que devem ser repostas no início de cada jornada de trabalho:

- ∴ Soro fisiológico, para efetuar diluições das amostras;
- ∴ Água purificada, utilizada nas lavagens;
- ∴ *ISE Baseline Solution*, solução de referência que afere os elétrodos entre ensaios;
- ∴ *ISE Buffer 2*, tamponamento das reações ISE;
- ∴ *Reaction Bath Oil,* banho reacional de 37°C;
- ∴ *Cuvette conditioner and detergent*, ciclos de lavagem de cuvetes de reação.

Figura 10 – Soluções consumíveis do ADVIA® Chemistry XPT.

De seguida, deve-se verificar os RTT's quanto à necessidade de reposição de reagentes que acabaram, que possuam um número baixo de testes, ou que o prazo de validade ou da estabilidade a bordo esteja a caducar. Efetivamente, a interface informática alerta para estas ações assim como fornece o inventário dos reagentes que contém.

Adicionalmente, a água destilada, o soro fisiológico estéril e os detergentes de lavagem das sondas devem ser repostos em cada RTT. Finalizando esta operação, realiza-se o scan dos reagentes. Esta operação identifica cada reagente através dos códigos de barra impressos nas suas lombadas, assim como mede os volumes, calculando a respetiva quantidade de testes disponíveis.

Concluído o scan com sucesso, iniciam-se as calibrações necessárias e CQI (Figura 11). O CQI do ionograma ocorre pela inserção de soluções de CQI para soro e urina, cada uma com nível alto e baixo. Adiciona-se também o detergente ISE. Para as restantes técnicas, primeiramente, passam-se as calibrações necessárias e verifica-se o seu sucesso. No caso afirmativo, estamos aptos para iniciar os CQI. A Tabela 7 elucida quanto à alternância diária dos níveis dos CQI, mediante o dia da semana.

Tabela 7 – Distribuição dos níveis de controlo de qualidade interno nos dias da semana.

Dia da semana	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Segunda-feira	X	X	
Terça-feira		X	X
Quarta-feira	X		X
Quinta-feira	X	X	
Sexta-feira		X	X
Sábado	X		X

Todas as tarefas descritas devem ser realizadas em duplicado para os dois analisadores com o objetivo de preparar os equipamentos com tudo o que possa ser necessário para um dia completo de trabalho, evitando interrupções no *workflow*.

Figura 11 – Controlos de qualidade internos dos ADVIA® Chemistry XPT. A – Níveis 1,2 e 3 de Multiqual. B – Níveis 1, 2 e 3 de Immunology. C – Níveis 1 e 2 para urina. D – Níveis 1 e 2 para microalbuminúria. E – Níveis 2 e 3 para marcadores cardíacos.

6.1.2. Métodos

Os métodos utilizados pelos ADVIA® Chemistry XPT são os descritos abaixo.

∴ Potenciometria: usada nas determinações das concentrações dos eletrólitos[10] nas amostras, ou seja, das reações ISE ou ionograma. Dispositivo composto por elétrodo de referência (que deve manter o seu potencial constante) e elétrodo

indicador/seletivo de ião (sensível ao ião de interesse) para Na^+, K^+ e Cl^-. Contatam com a amostra e estão interligados por voltímetro, perfazendo a célula galvânica. A diferença de potencial elétrico entre os elétrodos é medida na ausência de corrente elétrica significativa. Com base na equação de *Nernst,* o potencial é calculado e será diretamente proporcional à concentração do ião[11].

∴ Fotometria: define-se como a quantidade de luz absorvida por uma dada solução numa gama alargada do espetro da luz – do infravermelho ao ultravioleta, passando pelo visível. A lâmpada de halogénio é a fonte do feixe de luz que incide na amostra. O feixe resultante incide sobre o detetor, que o converte num sinal elétrico proporcional à concentração do analito de interesse na amostra[12]. Recurso à transmitância/absorvância encontradas e à lei de *Lambert-Beer*.

∴ Turbidimetria: composto por um sistema ótico semelhante ao da fotometria que mede a atenuação da intensidade de um feixe de luz que incidiu previamente num meio com partículas insolúveis (suspensão). A luz do feixe pode ser absorvida, refletida, dispersa e transmitida em função do tipo e quantidade de partículas de interesse presentes no meio reacional.[13]

6.1.3. Parâmetros analíticos determinados

A Tabela 8 pretende descrever os parâmetros analíticos usualmente determinados na secção da Bioquímica, assim como as metodologias empregues pelo ADVIA® Chemistry XPT para esse fim. A informação é complementada pelos VR para o soro.

Tabela 8 – Parâmetros analíticos determinados no ADVIA® Chemistry XPT, metodologias associadas à amostra de soro e valores de referência para o indivíduo adulto.

Parâmetro analítico	Método	Valores de Referência (soro)
Ácido Úrico	Espetrofotometria – M. Enzimático	H: 3,7 – 9,2 mg/dL M: 3,1 – 7,8 mg/dL
Albumina	Espetrofotometria - Colorimetria	3,2 – 4,8 g/dL
Aldolase	Espetrofotometria – M. Cinético	<7,6 U/L
Alanina aminotransferase	Espetrofotometria – M. Cinético	10 – 49 U/L
Amilase	Espetrofotometria – M. Enzimático	30 – 118 U/L
Amilase Pancreática	Espetrofotometria – M. Enzimático	25 – 125 U/L
Aspartato aminotransferase	Espetrofotometria – M. Cinético	<34 U/L
Bilirrubina total	Espetrofotometria - Colorimetria	0,3 – 1,2 mg/dL
Bilirrubina direta	Espetrofotometria - Colorimetria	<0,3 mg/L
Complemento 3	Imunoturbidimetria com PEG	90 – 180 mg/dL
Complemento 4	Imunoturbidimetria com PEG	16 – 38 mg/dL

Parâmetro analítico		Método	Valores de Referência (soro)
Ca^{2+}		Espetrofotometria - colorimetria	8,7 – 10,4 mg/dL
Creatina cinase total		Espetrofotometria – m. cinético	H: 32 – 294 U/L M: 33 – 211 U/L
CO_2		Espetrofotometria – m. enzimático	10 – 40 mmol/L
Colesterol total		Espetrofotometria – m. enzimático	<190 mg/dL
Colesterol-LDL		Espetrofotometria – m. enzimático	<110 mg/dL
Colesterol-HDL		Espetrofotometria – m. enzimático	45 – 65 mg/dL
Creatinina		Espetrofotometria – m. cinético	H: 0,7 – 1,30 mg/dL M: 0,5 – 1,1 mg/dL
Etanol		Espetrofotometria – m. enzimático	10 – 500 mg/dL
Fator Reumatoide		Imunoturbidimetria com latex	<14 IU/mL
Ferro		Espetrofotometria - colorimetria	H: 65 – 175 µg/dL M: 50 – 170 µg/dL
Fosfatase alcalina		Espetrofotometria - colorimetria	46 – 116 U/L
γ-glutamil transferase		Espetrofotometria – m. enzimático	<38 U/L
Glucose		Espetrofotometria – m. enzimático	70 – 110 mg/dL
Imunoglobulina A		Imunoturbidimetria com latex	40 – 350 mg/dL
Imunoglobulina G		Imunoturbidimetria com latex	650 – 1600 mg/dL
Imunoglobulina M		Imunoturbidimetria com latex	50 – 300 mg/dL
Ionograma	K^+	Potenciometria com elétrodo seletivo de iões	3,5 – 5,5 mmol/L
	Na^+		132 – 146 mmol/L
	Cl^-		99 – 109 mmol/L
Lactato Desidrogenase		Espetrofotometria – m. cinético	120 – 246 U/L
Lipase		Espetrofotometria – m. enzimático	12 – 53 U/L
Mg^{2+}		Espetrofotometria – colorimetria	1,3 – 2,7 mg/dL
Proteína C reativa		Imunoturbidimetria com latex	0 – 0,05 mg/dL
Proteínas Totais		Espetrofotometria – colorimetria	5,7 – 8,2 g/dL
Transferrina		Imunoturbidimetria com PEG	H: 215 – 365 mg/dL M: 250 – 380 mg/dL
Triglicéridos		Espetrofotometria – m. enzimático	<150 mg/dL
Ureia		Espetrofotometria – m. cinético	<50 mg/dL

LDL= Lipoproteína de baixa densidade; HDL= Lipoproteína de alta densidade; m= Método; H= Homem; M=Mulher; PEG= Polietienoglicol;

6.1.4. Validação analítica

Após executadas as determinações analíticas, os resultados são automaticamente transferidos para a bolsa informática de validação no programa APPOLO. Os técnicos da secção são responsáveis pela sua validação analítica, assim como por uma pré-validação biopatológica. A correta interpretação dos resultados assenta na comparação com os VR adaptados à idade, sexo, raça, e demografia da população que o laboratório serve.

Os técnicos recorrem à aplicação dos seus vastos conhecimentos teóricos e práticos para assim realizarem um escrutínio das amostras a repetir. Adicionalmente, os achados contendo valores considerados como críticos são imediatamente reportados aos patologistas responsáveis, assegurando uma maior urgência na gestão destas amostras.

Quando deparados com um resultado dúbio, ou que pela sua magnitude justificam uma repetição, lançam a ordem no sistema obtendo-se a confirmação dos resultados em apenas alguns minutos. O conhecimento das situações em que uma repetição é necessária é essencial, assim como a aplicação das respetivas medidas corretivas, se aplicáveis. As motivações mais frequentes para a realização de uma repetição são:

∴ Parâmetros mais afetados pela hemólise, lipémia e icterícia;

∴ Determinações que fogem ao LoQ, quer superior, quer inferiormente;

∴ Analitos instáveis e afetados por fatores externos (temperatura e humidade);

∴ Histórico clínico discordante com os achados atuais;

∴ Incongruências aparentes nos resultados.

6.2. Setor das Urinas tipo II – Exame sumário de urina

Este setor pertencente à Bioquímica tem como função a realização das metodologias da urina tipo II, incluindo a observação dos sedimentos urinários, assim como realizar testes imunocromatográficos a drogas e de gravidez na urina.

As atividades laboratoriais desta secção são realizadas em quatro equipamentos: três UNAMAX e pelo SediMAX conTRUST PRO (Figura 12). A sua combinação cria uma solução totalmente automatizada para a análise das urinas de elevado rendimento analítico. A sumária de urina permite fazer uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa de parâmetros químicos e da presença ou ausência de certos elementos biológicos.

A jornada de trabalho é iniciada pela manutenção e lavagem dos equipamentos. Dever-se-á repor os contentores de água destilada e esvaziar os reservatórios de resíduos. Uma limpeza manual dos componentes internos dos equipamentos é também necessária. Os consumíveis que os equipamentos utilizam deverão ser repostos, sendo exemplo as tiras teste utilizadas nas análises pelo UNAMAX.

Posteriormente, os equipamentos estão aptos a realizar os CQI. Matrizes adquiridas nas casas comerciais mimetizam amostras cujos resultados são conhecidos, e como tal os valores obtidos no CQI devem ser idênticos. Os procedimentos de manutenção e CQI encontram-se na sua maioria automatizados.

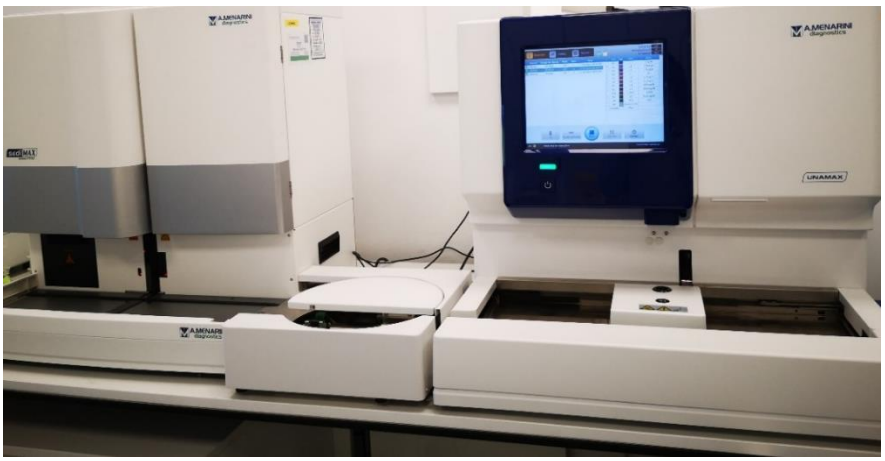


Figura 12 – UNAMAX (à direita) e SediMAX conTRUST PRO (à esquerda) conectados em cadeia. A. Menarini Diagnostics.

6.2.1. UNAMAX

Os UNAMAX entregam resultados químicos e físicos para cerca de três centenas de amostras por hora e para tal utilizam tiras-teste LabUSticks 11F (Figura 13). A deposição precisa de urina em cada área teste da tira permite a reação dos seus constituintes com a amostra, originando a mudança da coloração, que é então detetada pelo fotómetro.

Cada equipamento tem implementado um leitor de códigos de barras identificadores das amostras, mas também um leitor de reconhecimento de *racks* para uma total rastreabilidade das mesmas. Adicionalmente, conta com um ecrã policromático que exibe a imagem real das tiras após reação a temperatura controlada, proporcionando a revisão e validação dos resultados (Figura 14).

As tecnologias que emprega são as seguintes:

∴ Fotometria de refletância a cinco comprimentos de onda distintos;

∴ Gravidade específica pelo método do refratómero;

∴ Turvação pelo método da dispersão;

∴ Cor pela medição da transmissão de luz.

Os parâmetros que avalia são: ácido ascórbico (Asc.), leucócitos (Leu.), corpos cetónicos (Ket.), nitritos (Nit.), urobilinogénio (Uro.), bilirrubina (Bil.), proteínas (Pro.), glucose (Glu.), gravidade específica/densidade (S.G.), sangue (Blo.), pH, gravidade específica, cor e turvação[14].

Figura 13 – Tiras teste LabUSticks 11F usadas para urianálise no UNAMAX.

Figura 14 – Controlo de qualidade interno da análise química e física à urina pelo UNAMAX. Nível normal (à esquerda), nível patológico (à direita).

6.2.2. SediMAX conTRUST PRO

Sistema automatizado que avalia e reporta os achados da urianálise em ecrã. Aspira e centrifuga a amostra a bordo para a obtenção do sedimento urinário. Na prática, captura imagens dos campos de visualização (Figura 15) que seriam observados por um operador ao microscópio, porém com maior rapidez, segurança e precisão.

A tecnologia patente no equipamento é a microscopia de campo claro e de contraste de fase aplicadas num único sistema ótico. A câmara digital incorporada possui uma técnica de focagem dupla, captando quinze imagens representativas dos detalhes morfológicos da amostra. Estas são sujeitas a avaliação pelo sistema informático que executa uma pré-identificação das estruturas presentes[15].

O técnico valida os resultados de cada amostra através da visualização das imagens captadas. Fazendo uso de espírito crítico, interpreta rigorosamente as contagens dos elementos e a presunção da identificação dos mesmos pelo sistema. Paralelamente, é possível observar a morfologia bacteriana predominante (cocos e bacilos).

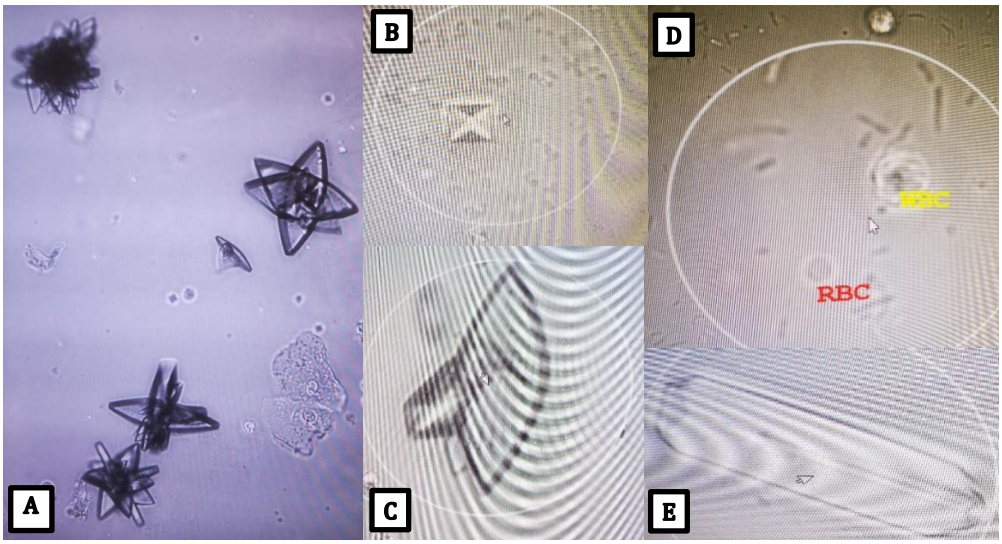
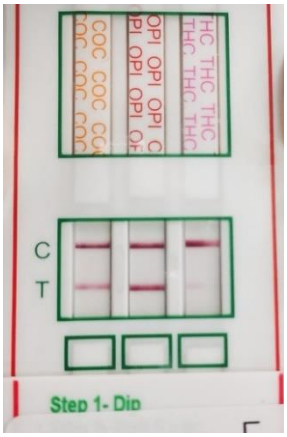


Figura 15 – Imagens captadas pelo SediMAX conTRUST PRO a amostras de urina. Cursor com zoom dinâmico. A – Cristais de ácido úrico (agrupado em roseta); B – Cristais de oxalato de cálcio. C – Cristal de ácido úrico (romboide); D – Identificação pelo sistema de eritrócito e leucócito; E – Cristal de fosfato triplo.

6.2.3. Testes imunocromatográficos

Os testes imunocromatográficos realizados nesta secção são de cariz manual e com recurso a cassetes de fluxo lateral. Tratam-se de testes rápidos para deteção qualitativa de drogas ou estado de gravidez.



O operador deposita a urina no local predefinido e aguarda o tempo recomendado pela casa comercial para a leitura dos resultados. A presença da linha do controlo afere quanto à validade do teste. A presença da linha teste indica um resultado positivo enquanto a sua ausência identifica um resultado negativo.

Sempre que requeridos ao abrigo da lei, os testes a drogas devem ser guardados por um longo período de tempo, como é o caso do exemplo da Figura 16.

Figura 16 – Teste imunocromatográfico para deteção qualitativa de drogas: cocaína, opióides e tetrahidrocanabinol. Teste positivo para consumo de cocaína e opióides.

6.3. Avaliação da função hepatobiliar

O tecido hepático tem um papel fulcral no organismo ao desempenhar importantes funções como síntese proteica, excreção, metabolização e desintoxicação. Aquando da sua lesão, os hepatócitos ou as células dos ductos biliares são destruídas e libertam o seu conteúdo para a circulação, pelo que podemos aferir da ocorrência destes processos necróticos através da pesquisa de alterações analíticas.

A alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) são duas enzimas que se podem encontrar elevadas na corrente sanguínea quando ocorre lesão hepática. No entanto, estas são enzimas que se encontram distribuídas pelo corpo em tecidos como o rim e músculos cardíaco e esquelético. Efetivamente, podem e devem ser utilizadas na avaliação do dano hepático, porém associadas de outros parâmetros que validem, no seu conjunto, a especificidade do local da lesão.

Adicionalmente, a ALT detém maior expressão neste tecido e, portanto, confere maior segurança na associação à lesão hepática. Por outro lado, a AST é uma enzima indutível pelo que a presença de certos xenobióticos que estimulam os fenómenos de metabolização hepática farão aumentar a sua concentração, independentemente da existência de dano tecidular.

Dado que o local primordial da síntese das proteínas é o fígado, a potencial falha nos processos sintéticos e, consequentemente, um certo nível de extensão da lesão é validada pela diminuição da albumina e pelo aumento do tempo de protrombina.

Igualmente, um olhar atento sobre os parâmetros relacionados à bilirrubina pode ser de grande utilidade. A bilirrubina, insolúvel, origina-se nos processos de destruição dos eritrócitos, sendo conjugada no hepatócito a bilirrubina direta, mais hidrossolúvel e apta para excreção. O aumento da bilirrubina total pode ter como causas o aumento da sua produção ou a diminuição da sua conjugação. A interpretação da relação entre bilirrubina indireta e direta pode ajudar a esclarecer a etiologia da situação, sendo que, se a elevação for da bilirrubina indireta, isto reflete uma incapacidade de conjugação pelo fígado, compatível com dano hepático.

As funções metabólicas do fígado são tantas que a sua lesão pode levar a imensas repercussões. Homeostasia anormal da glucose associada à falha na gluconeogénese, manifestada por hipoglicémias ou alterações no metabolismo dos lípidos é um dos exemplos. O aumento do colesterol e dos triglicéridos (TG) é justificável dado que é o fígado o responsável pela produção das lipoproteínas.

Contrariamente, uma elevação das enzimas fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase (GGT) apontam para lesão nos ductos biliares. A fosfatase alcalina existe em grandes concentrações não só nestes canais, como também no osso. Situações de elevado *turnover* ósseo como é o caso de crianças em fase de crescimento ou tumores levam a uma subida deste parâmetro. A GGT é mais um caso de enzima inespecífica, sendo inerentemente indutível aquando do aumento da necessidade de metabolização hepática. A associação da subida destas duas últimas com níveis aumentados de bilirrubina, principalmente de bilirrubina direta, direciona a um diagnóstico de colestase.[16–18]

6.4. Avaliação da função renal e hidro-eletrolítica

O rim, diante do seu pequeníssimo volume, é um órgão que detém inúmeras funções. Para além da filtração de todo o volume sanguíneo, intervém na homeostasia dos sais e iões, proporcionando o equilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-base e, portanto, determinando a composição dos fluidos corporais. Adicionalmente, tem uma importante função endócrina traduzida na secreção da renina, vitamina D e eritropoietina. Mais, é o fator chave na excreção da ureia, creatinina, ácido úrico e xenobióticos.

A taxa de filtração glomerular, normalmente determinada pela clearance da creatinina, é um dos parâmetros mais solicitados para avaliar o rim, mais propriamente a idoneidade do glomérulo. Na lesão renal, este parâmetro pode diminuir acentuadamente.

A creatinina e a ureia refletem satisfatoriamente a capacidade funcional do rim. A creatinina é mais específica do tecido renal, visto que a ureia pode elevar-se por um simples aumento do consumo de purinas. Todavia, aquando da instalação do dano renal, a ureia é um parâmetro mais sensível de deteção dos seus estadios iniciais.

Em casos de anemias com etiologia desconhecida pode ser útil realizar o diagnóstico diferencial incluindo a avaliação renal com pesquisa de uma potencial diminuição da produção de eritropoietina. Do mesmo modo, a hipocalcemia pode ter a sua origem na diminuta secreção do calcitriol.

Finalmente, o ionograma é uma excelente ferramenta na avaliação dos doentes com lesão renal já algo pronunciada. No entanto, cuidados devem ser tidos: a elevação do K^+ deve sempre ser validada tendo em consideração os índices de hemólise. Tratando-se de um catião maioritariamente intracelular e largamente presente nos eritrócitos, o seu aumento pode estar apenas relacionado com a lise das referidas células. A lesão renal pode ainda causar desequilíbrios osmóticos, afetando a composição dos fluidos celulares, pelo que se devem valorizar as alterações do pH assim como do Na^+ e do Cl^-.

No que concerne à análise da urina tipo II, critérios como a presença de glicosúria, proteinúria, hematúria, Na^+ e fosfatase alcalina – muito presente nos túbulos renais, que ao serem destruídos, libertam-na – são de extrema relevância para complementar os achados na circulação sanguínea.[19,20]

6.5. Avaliação da função pancreática

O pâncreas é um órgão que intercede no bem-estar metabólico de forma única. Tem funções endócrinas e exócrinas ao secretar respetivamente hormonas – insulina, glucagon, somatostatina e gastrina - pelas ilhas de Langerhans e o suco pancreático, rico em enzimas fundamentais para a digestão, nas glândulas acinares.

A amilase secretada pelas glândulas exócrinas do pâncreas atua no bolo alimentar quebrando as ligações 1,4-glicosídicas do amido e glicogénio, facilitando a sua absorção. A enzima é produzida em alguns tecidos no organismo, porém o laboratório adota uma técnica para a quantificação específica da amilase pancreática através de um passo inicial de inibição das restantes isoformas. Peritonite ou pancreatite aguda podem traduzir-se num valor

aumentado da enzima, enquanto a insuficiência pancreática leva a uma redução do parâmetro. A amilase total pode, no entanto, também ser alvo de quantificação para assim se poder realizar o diagnóstico diferencial com lesões em locais onde esta enzima também seja produzida, como os pulmões ou as glândulas salivares.

A lipase também é aqui produzida para ser libertada no duodeno, o que é crucial na hidrólise dos TG. Quando aumentada em circulação é importante considerar a hipótese de lesão pancreática pois trata-se de um parâmetro mais específico que a amilase total e que permanece mais tempo em circulação. Ademais, a determinação conjunta dos dois parâmetros confere uma maior confiança no diagnóstico de dano pancreático.

Finalmente, desordens na homeostasia da glucose podem refletir uma degradação das células das ilhas de *Langerhans*, afetando a produção de insulina e glucagon. Défices da produção destas hormonas podem traduzir-se também em disfunções no metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas. As alterações na glucose serão em seguida descortinadas no âmbito da avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono.[17,21]

6.6. Avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono

A avaliação da glicémia em jejum é certamente uma das determinações analíticas mais solicitadas laboratorialmente. O despiste de patologias relacionadas com hipo e hiperglicémias é o principal objetivo, sendo a prevenção e a monitorização de utentes com Diabetes *mellitus* tipo 2 a motivação mais usual na análise deste parâmetro.

Adicionalmente, a realização da prova de tolerância à glucose oral (PTGO) é muito requisitada, sendo realizada no acompanhamento pré-natal e também por utentes que justifiquem uma pesquisa mais aprofundada do metabolismo glucídico. Esta prova consiste em ingerir 75g de glucose e avaliar a mesma em circulação às 0h, 60 e 120 minutos, habitualmente. A prova deverá fornecer uma curva em arco cujo valor de pico é aos 60 min, assegurando a correta identificação dos tubos pela sua ordem de colheita.

A HbA1c, determinada na Hematologia, é um critério essencial no acompanhamento da disfunção da homeostase da glicose. A membrana dos eritrócitos é permeável à glicose, pelo que ela consegue penetrá-los e ligar-se covalentemente à hemoglobina. Esta ligação ocorre com uma magnitude proporcional às concentrações de glucose no plasma. A HbA1c reflete os níveis médios de glicose nos últimos três meses aproximadamente, correspondendo à vida média do eritrócito.[22]

Os critérios da Direção-Geral de Saúde para o diagnóstico da diabetes na população em geral em plasma venoso são glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL, glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL acompanhada de sintoma clássico, glicemia ≥ 200mg/dL aos 120 minutos da PTGO ou uma Hb1Ac ≥ 6,5%. Os critérios para o diagnóstico da diabetes gestacional diferem dos descritos, pelo que devem ser devidamente aplicados. Sempre que necessário, o diagnóstico deverá ser confirmado num segundo momento de análise.[23]

6.7. Avaliação do risco cardiovascular

A avaliação cardiovascular contempla o estudo dos fatores que concorrem para o aumento do risco da incidência de doenças cardiovasculares (DCV). As DCV são, nos dias de hoje, a principal causa de mortalidade em Portugal[24]. A hipertensão, sedentarismo, obesidade, diabetes, tabagismo, consumo de álcool e as dislipidemias são fatores de risco que se potenciam mutuamente, tendo um efeito sinérgico e nefasto nos doentes[25].

Os lípidos desempenham funções únicas e essenciais para a sobrevivência dos organismos: participam na composição e estrutura celulares, são parte crucial do sistema endócrino, da formação dos ácidos biliares, da vitamina D e são uma importante fonte de energia. No entanto, fatores genéticos e estilos de vida pouco saudáveis dão lugar a uma desregulação do metabolismo lipídico – as dislipidemias. Estas traduzem-se num risco aumentado de instalação dos processos ateroscleróticos, caracterizados por acumulação de gordura e estado inflamatório crónico da íntima das artérias, o que pode culminar no enfarte agudo do miocárdio (EAM) ou no acidente vascular cerebral, com consequente encargo na morbilidade e mortalidade das populações[26].

Os lípidos sofrem transporte na corrente sanguínea associados a complexos proteicos denominados de lipoproteínas, classificadas consoante o seu conteúdo, densidade e tamanho. São elas os quilomícron, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL).

O colesterol provém fundamentalmente da síntese endógena pelo fígado, mecanismo regulado e operado pela hidroxi-metil-glutamil-CoenzimaA redutase e em menor grau da dieta. Os TG têm como principal fonte a alimentação, entrando na circulação sob a forma de quilomícron e são também mobilizados das reservas no tecido adiposo, transportados pelas VLDL.

A avaliação do perfil lipídico consiste na determinação dos TG, colesterol-HDL, colesterol-LDL e colesterol total. O tempo de jejum ideal é de 10h a 12h, já que principalmente

a concentração dos TG se altera bastante no soro no período pós-prandial. Contudo, alterações lipídicas podem ser encontradas na doença renal, hipotireoidismo, síndrome metabólico e colestase.

O colesterol-HDL é um colesterol "protetor" na medida em que a sua função é capturar e encaminhar o colesterol dos tecidos periféricos e da circulação, através do transporte reverso, para ser utilizado no fígado. A sua concentração no sangue é por norma inversamente proporcional ao risco de DCV.

Contrariamente, níveis elevados de colesterol-LDL aumentam a probabilidade de estabelecimento de DCV devido às suas propriedades ateroscleróticas visto que a sua função é levar o colesterol aos tecidos. O bom funcionamento dos recetores específicos que reconhecem as LDL determinam a correta utilização pelas células periféricas e evitam a sua acumulação em circulação. Os níveis elevados de colesterol total e de TG – hipercolestorolémia e hipertrigliceridémia, respetivamente – correlacionam-se positivamente com o risco de DCV.[27]

A determinação da lipoproteína (a) e das LDL oxidadas pode auxiliar bastante na caracterização do risco de DCV, apesar de ainda pouco requisitadas pelos clínicos.

6.8. Avaliação do metabolismo do ferro

O ferro é um elemento químico que intervém em processos metabólicos importantes, desde o transporte e fixação do oxigénio aos tecidos pela hemoglobina e mioglobina, à participação nas reações de metabolismo de oxidação e redução celular.

O ião provém da dieta e da reciclagem do grupo porfirina eritrocitário. Todavia, o organismo não possui mecanismos de excreção ativa do ferro em excesso assim como o seu armazenamento pode tornar-se tóxico. Efetivamente, o principal mecanismo que contribui para a homeostasia é a regulação da absorção a nível intestinal[28].

A transferrina é uma glicoproteína que transporta o ferro na circulação através dos dois locais de ligação que possui. Encaminha-o à medula óssea para participar na eritropoiese assim como faz a sua entrega à ferritina, que atua como reservatório do ião. Geralmente, encontra-se elevada nas deficiências de ferro e diminuída quando há sobrecargas deste. No decurso da inflamação encontra-se diminuída, visto tratar-se de uma proteína de fase aguda negativa.

A deficiência em ferro, comum na infância, anemias e gravidez, aumenta não só os níveis de transferrina em circulação, mas também a capacidade total de fixação de ferro. A anemia

ferropénica é um dos exemplos mais flagrantes, quer por défice de ingestão ou de absorção, quer decorrente de processos hemorrágicos.

A ferritina é uma glicoproteína que armazena o ferro no meio intracelular, protegendo o organismo dos potenciais efeitos tóxicos do ferro. Fá-lo no fígado, baço e medula óssea. O seu doseamento é útil na suspeita de anemia ferropénica, onde se encontra diminuída e igualmente na anemia hemolítica ou hemocromatose onde o seu valor aparece elevado. Esta proteína é também caracterizada por ser uma proteína de fase aguda positiva da inflamação, encontrando-se elevada nestes estados patológicos.[18,29]

6.9. Marcadores de inflamação e lise celular

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda positiva da inflamação, elevando-se nestes processos. A subida em relação aos VR ocorre também nos processos cancerígenos, infeciosos e na aterosclerose. Tal como a VS, é caracterizada por ser inespecífica quanto ao tecido ou etiologia da sua origem, porém fornece dados essenciais que auxiliam o diagnóstico e a monitorização dos doentes.

A creatina cinase (CK) é uma enzima presente em tecidos com uma elevada demanda energética e que possui várias isoformas. A determinação da CK-total constata a destruição muscular (a isoforma cerebral não tem capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica)[17]. No entanto, não especifica se o dano é no músculo cardíaco ou no músculo esquelético. Exercício físico intenso, traumas musculares ou crises convulsivas, entre outros, podem aumentar este parâmetro de forma exponencial. A isoforma CK-MB é a prevalente no músculo cardíaco, pelo que deve ser doseada na suspeita de EAM.[26]

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima intracelular amplamente distribuída em todos os tecidos graças à intervenção no metabolismo energético, necessário em qualquer célula[17]. Fisiologicamente, as concentrações presentes no plasma advêm maioritariamente do metabolismo celular dos eritrócitos e das plaquetas. Em situações patológicas de lise, como é o caso do EAM ou do trauma muscular, o conteúdo celular é libertado e o seu valor aumenta em circulação. De notar que uma amostra hemolisada terá um valor de LDH superior ao VR devido à destruição dos eritrócitos, assim como também um aumento de K^{+}[20]. Espírito crítico e uma atenta validação dos resultados são da maior importância para o devido escrutínio dos achados.[26]

O fator reumatoide é realizado no laboratório tanto por requisição direta como para confirmação da prova de Waaler Rose realizada primeiramente pela imunoserologia. Trata-se

habitualmente de IgM reativas contra o domínio constante das IgG humanas. Embora possam ocorrer reações cruzadas e, portanto, o teste careça de especificidade, o seu valor preditivo positivo é elevado pois um doente que sofra de artrite reumatoide tem uma grande probabilidade de ter um teste positivo.[30]

6.10. Caso Clínico – Nimesulida como indutora de morte por insuficiência hepática aguda

Derivado da limitação de casos que surgiram na rotina laboratorial durante o estágio, seleciono uma temática relevante descrita na literatura para assim fazer um escrutínio aprofundado dos conhecimentos que adquiri. Assim, segue-se a descrição e respetiva reflexão acerca do caso relatado por Nogueira-Sousa et al.[31]

Introdução

A nimesulida é um fármaco pertencente à classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), compostos químicos que travam a cascata da inflamação através da inibição da formação das prostaglandinas, que medeiam o mecanismo inflamatório. Com efeito, exibe uma marcada atividade analgésica, anti-inflamatória e anti-pirética[32].

Em Portugal, as suas formulações orais são medicamentos sujeitos a receita médica e, portanto, apenas utilizados sob o regime de prescrição. Deve ser contemplada como terapêutica de segunda linha e após avaliação individualizada. A distinta predisposição para a toxicidade induzida pela nimesulida obedece a aspetos inter-individuais, caracterizando-se por uma etiologia idiossincrática.[33,34] Aconselha-se que a duração do tratamento seja curta, até um máximo de 15 dias[35].

A toma está contraindicada em indivíduos com compromisso hepático já instalado, na coadministração com outros fármacos de risco hepatotóxico ou que sofram de alcoolismo[35]. A terapêutica tem sido associada ao longo dos anos a casos de lesão hepática grave, consagrando-se como um dos AINEs que mais eventos hepáticos tem associados.

Trabalhos experimentais demonstram que a nimesulida contribui para a hiperplasia das células dos ductos biliares e promove a formação de espécies reativas que, para além de estabelecerem ligações covalentes a proteínas, induzem stress oxidativo e dano mitocondrial. Em última instância, dá-se a morte celular induzida pela redução do consumo de glutationa. O aumento do stress oxidativo leva ao desacoplamento da cadeia oxidativa e fosforilativa mitocondriais, assim como à alteração na permeabilidade transitória, tornando a célula incapaz de produzir energia e, portanto, de sobreviver.[36]

Descrição do caso

Uma mulher de 81 anos com funções renal e hepática anteriormente normais e sem histórico de reações adversas a medicamentos recorreu ao Serviço de Urgências relatando episódios de hematémese e epistaxis com duração de 2 dias. Aquando da sua hospitalização revelou a toma de nimesulida, 1 vez por dia, por 6 dias.

No exame físico verificou-se grande quantidade de hematomas difusos, epistaxis bilateral e melenas. Apresentava-se hipotensa (80 x 40 mmHg), com um ritmo cardíaco de 70 batimentos por minuto, frequência respiratória de 26 ciclos respiratórios por minuto e sudorética. Realizaram-se os testes laboratoriais considerados adequados na admissão e às 18h de hospitalização, cujos resultados se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados laboratoriais na admissão (0h) e às 18h de hospitalização.

	Parâmetro analítico	Resultados 0h	Resultados 18h	Valores de Referência
Perfil Hematológico	Eritrócitos	2,3	3.0	3,9 – 5,0 x 10^6 cél/µL
	Hemoglobina	9,0	10.8	12 – 15,5 g/dL
	Hematócrito	26,7	31.4	35 – 45%
	Leucócitos	19700	16500	4000 – 10000 cél/µL
	Plaquetas	96000	51000	150000 – 400000 cél/µL
Coagulação	Tempo de Protrombina	35,6	36.9	70-100%
	APTT	37.0	39.0	26 – 37 segundos
	Razão Normalizada Internacional	2.10	2.04	0.8 – 1.2
	Fibrinogénio	64	95	150 – 500 mg/dL
Gasimetria sanguínea	pH	7.22	7.27	7.350 – 7.450
	pO_2	49.5	91.8	80 – 110 mm/Hg
	Pco_2	31.6	30.0	35 – 45 mm/Hg
	HCO_3	12.4	13.3	23 – 26 mEq/L
	Excesso de base	-14.0	-12.2	-2 a 2
	CO_2 total	13.3	14.3	22 – 28 mmol/L
Perfil Renal	Ureia	75	88	15 – 38 mg/dL
	Creatinina	1.32	1.59	0.6 – 1.3 mg/dL
Perfil Hepático	Aspartato Transaminase	300	1159	10 – 31 U/L
	Alanina Transaminase	60	166	30 – 65 U/L
	Bilirrubina Total	3,96	5.24	0 – 1 mg/dL
	Bilirrubina Direta	3,57	3.70	0 – 0.3 mg/dL
	Bilirrubina Indireta	0.39	1.54	<0,7 mg/dL
	Gama-glutamil transferase	-	537	5-55 U/L
	Fosfatase Alcalina	-	260	50-136 U/L
Outros	Lactato	7.86	5.76	0.4 – 2 mmol/L
	Proteína C reativa	92.3	93.1	<3mg/L

APTT= Tempo de Tromboplastina Parcial ativada; pO_2= Pressão parcial de O_2; pCO_2= Pressão parcial de CO_2

Discussão

A população que apresenta maior suscetibilidade para o dano hepatotóxico induzido pela nimesulida são as mulheres com mais de 50 anos de idade, comummente com agravamento rápido mesmo com a cessação da terapêutica[31]. No caso, a posologia adotada é de curta duração, tal como aconselhado pelas autoridades competentes[35].

A interpretação dos resultados laboratoriais obtidos demonstra acidose metabólica como se pode constatar pelo valor de pH, ião bicarbonato, pressão parcial de CO_2 e ácido láctico. Contudo, uma alcalose respiratória compensatória está já instalada e patente num certo grau de hiperventilação de 26 ciclos respiratórios (VR: 12-20)[37].

O perfil hematológico indica presença de leucocitose, parâmetro que se eleva aquando fenómenos inflamatórios, infeciosos, cancerígenos, e de lesão tecidular. Mais, a proteína C reativa, biomarcador de inflamação, tem um aumento pronunciado.

Outra observação a atentar é a possível toxicidade hematológica na linha vermelha sustentada pelos baixos níveis de hemoglobina e diminuição da contagem de eritrócitos e hematócrito. Até à data não existem na literatura muitos exemplos desta associação, porém, o fármaco foi já apontado como agente etiológico de anemia hemolítica[38]. Esta hipótese não seria de descartar uma vez que os níveis de bilirrubina estão elevados, o que é compatível com um aumento da degradação eritrocitária[18].

A função renal está visivelmente afetada com elevação simultânea da ureia e da creatinina, uma dupla alteração que confere especificidade à lesão renal. A inibição das cicloxigenases e consequente diminuição na produção de prostaglandinas levam a vasoconstrição na circulação geral, mas também ao nível do rim, pelo que a perfusão é afetada, traduzindo-se em isquemia. Uma filtração deficiente evidente na diminuição da TFG leva ao acumulo de diversos compostos que são eliminados a menor velocidade.[19]

O rim é um órgão bastante suscetível à lesão visto que demanda uma enorme quantidade de energia para o cumprimento de todas as suas funções. Por conseguinte, as suas mitocôndrias têm de produzir ATP de modo a suplantar as necessidades. A produção de espécies reativas e consequente stress oxidativo aquando da metabolização da nimesulida[36] interferem no bem-estar bioenergético mitocondrial. Uma vez afetada a permeabilidade mitocondrial e/ou a cadeia fosforilativa os níveis de ATP caem, há desacoplamento mitocondrial e a célula, sem energia, morre[31,36]. O mesmo poderá acontecer nos hepatócitos, principalmente devido a stress oxidativo. A deficiente capacidade renal é também refletida na afeção do controlo hidro-eletrolítico[19,20].

O perfil hepático inicial caracteriza-se por uma ALT normal e uma AST 10 vezes superior aos VR. No entanto, um aumento das transaminases não garante a existência de lesão hepática[16]. O aumento isolado da AST será uma provável consequência da estimulação hepática adicional na tentativa de metabolizar o xenobiótico.

Os dados laboratoriais às 18h evidenciam uma deterioração hepática com aumento da ALT e da bilirrubina indiretas, antes dentro da normalidade. Verificou-se ausência de infeção

pelos vírus da hepatite B e C, todavia, a pesquisa da GGT e da fosfatase alcalina resultou em valores aumentados para os dois parâmetros.

Na admissão, apenas a bilirrubina total e bilirrubina direta se encontram acima dos VR. Uma bilirrubina indireta normal vem demonstrar que a função metabólica de conjugação da bilirrubina se mantém, evitando a acumulação da forma insolúvel. A determinação inicial da GGT e da fosfatase alcalina teria sido de grande utilidade por forma a excluir uma hiperbilirrubinémia pós-hepática. Com efeito, a colestase é comumente referida na literatura entre os danos hepáticos infligidos pela nimesulida[31].

Após 18h de hospitalização deteta-se o aumento da bilirrubina indireta e consequentemente algum nível de comprometimento do hepatócito. Concomitantemente, a AST sofre um forte aumento e a ALT está de igual forma elevada. A ALT, não sendo uma enzima indutível como a AST, complementado pelo aumento sincrónico dos vários parâmetros confere uma grande especificidade para a assunção segura de dano hepático.

O perfil da coagulação revela similarmente alterações em vários parâmetros. Diminuição de proteínas como o fibrinogénio e protrombina acarreta deficiência na via extrínseca e comum da cascata da coagulação. A deficiente capacidade de coagulação encontrada corrobora a grande extensão da lesão hepática acometida à utente, já que o fígado é a grande fábrica de síntese dos fatores de coagulação[16]. Este fator e o aumento de produção do lactato são ambas características da toxicidade da nimesulida[31].

A presença de melenas, hematémese, epistaxis, hipotensão, sudorese, perfil hematológico alterado e bilirrubina aumentada levam à suspeita de hemorragia no trato gastrointestinal superior, pelo que foi submetida a uma endoscopia gastrointestinal alta. Durante a hospitalização a utente foi também acompanhada pelo serviço de oncologia onde alguns marcadores tumorais se apresentaram elevados.

O estado de saúde da utente deteriora-se culminando em óbito. A investigação necroscópica conclui hepatite aguda com infiltrado inflamatório, necrose coagulativa e colapso hepatocelular, ocorrências descritas anteriormente na administração do fármaco[33,34]. Confirma-se ainda a presença de adenocarcinoma hepático.

Diante de um caso em que a toxicidade ocorre em vários sistemas de órgãos torna-se quase que uma imposição a implementação de ferramentas que previnam desfechos como este. Desta forma, o doente deverá ser acompanhado laboratorialmente com biomarcadores de início de lesão, os chamados biomarcadores de previsão. Diversos marcadores encontram-se em investigação para os diferentes sistemas de órgão. Arginase-1, desidrogenase glutâmica e α-glutationa-S-transferase são hoje os mais pesquisados na suspeita de lesão hepática enquanto a Clearance da cistatina C e a microalbuminúria das 24h são excelentes métodos

para avaliar o comprometimento glomerular recente. Deve o clínico optar pela determinação dos parâmetros que assegurem a prevenção de doença para cada caso particular.

Conclusão

Nesta ocorrência comprova-se o dano hepático bioquímica e histologicamente. Uma maior suscetibilidade a dano hepático pela nimesulida e o tumor aí alojado, afetando seguramente a ótima função do tecido, contribuíram seguramente para um desfecho fatal.

A administração da nimesulida deve ser reservada a situações em que se assegure a relação risco/benefício para cada doente, fruto de ponderação cuidada e individualizada.

Nos casos em que a terapêutica é instituída, é da maior importância a monitorização clínica do doente através da determinação de biomarcadores de previsão de forma a garantir a segurança do mesmo ao longo de todo o processo farmacológico, mesmo após a cessação do fármaco. Deste modo, a perturbação no órgão seria detetada muito cedo, evitando-se lesão.

7. MICROBIOLOGIA

O sector que compreende as análises microbiológicas situa-se no 2º piso do laboratório e é coordenado pela técnica superior Vânia Pereira. O elevado volume, variedade e complexidade no tratamento das amostras que aqui chegam justificam a existência de uma equipa robusta e bem qualificada, tanto teoricamente como na componente mais prática e manual inerente a estes procedimentos.

A microbiologia define-se como o estudo dos microrganismos (MO) – seres unicelulares, acelulares e multicelulares – largas vezes impercetíveis a olho nu, e do modo como se relacionam com o ambiente e com os restantes seres vivos[39]. Assim, as práticas laboratoriais surgem associadas às bactérias, fungos, parasitas, vírus e protozoários.

Estudos apontam que o ser humano alberga entre 10 a 100 triliões de micróbios, numa espécie de comum acordo vantajoso a que chamamos simbiose[40], ou apenas com proveito unilateral, o comensalismo. Diversas vezes a relação é benéfica para ambos e essencial para a sobrevivência[41], porém, em certas situações, estas entidades podem vir a causar dano e consequentemente desencadear um estado patológico.

A microbiologia aplicada à clínica reveste-se de uma enorme importância ao investigar a etiologia e a melhor forma de cessar uma infeção estabelecida devido a processos de invasão ou de proliferação anormal destes micróbios[42]. No diagnóstico microbiológico são utilizadas ferramentas como o exame microscópico e cultural, as provas complementares de identificação, os métodos e equipamentos para identificar e executar os testes de suscetibilidade e os testes imunocromatográficos.

O estágio permitiu-me participar nas atividades laboratoriais microbiológicas ao desempenhar a manutenção dos equipamentos, preparação de amostras, inoculação em meios de cultura, realização de sementeiras, testes de suscetibilidade, visualização macro e microscópica, realização de coloração manual, análise e validação de resultados. Como laboratório de rotina e de apoio à comunidade que é, reflete as necessidades da população que serve, pelo que os casos são na sua maioria de etiologia bacteriana.

7.1. Exame microscópico

O exame microscópico direto das amostras é essencial para a identificação de um MO. A observação do esfregaço entre lâmina e lamela do produto biológico fresco é muitas vezes

o primeiro passo do processo da identificação, possibilitando a visualização das estruturas tal como elas se apresentam no local de infeção.

A verificação da morfologia e elementos celulares associados permite a orientação da pesquisa do MO assim como a identificação presuntiva, em alguns casos. Este dado pode ser particularmente importante na presença de MO fastidiosos ou de crescimento lento. Mais ainda, esta observação permite aferir quanto à qualidade das amostras.

O exame microscópico a fresco é executado não só diretamente da amostra biológica mas também a partir de meios de cultura líquidos e sólidos, utilizando a objetiva de 40x, com o condensador em baixo e o diafragma ligeiramente fechado para melhor visualização da lâmina não corada.

Com a finalidade de melhor distinguir a morfologia dos achados empregam-se colorações às lâminas das amostras, aumentando o contraste das estruturas. A coloração mais comummente utilizada é a de Gram que cora as bactérias de forma diversa consoante a composição das suas paredes celulares. As diferenças na estrutura e na permeabilidade permitem que estas adquiram tonalidades distintas, ficando as de Gram positivo (Gr+) coradas de roxo e as de Gram negativo (Gr-) coradas de rosa. A coloração de Gram das lâminas é automatizada através do PREVI® Color Gram da BioMérieux.

Outra das colorações utilizadas no dia-a-dia laboratorial é a de Ziehl-Neelsen, empregue na pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes. A técnica cora os bacilos de vermelho, que nitidamente se destacam do fundo azul.[43]

7.2. Meios de cultura

A informação do tipo de amostra, nomeadamente a localização do tecido colhido, fatos clínicos relevantes como sintomas e exame físico, assim como as observações do exame microscópico direto permitem realizar a escolha adequada dos meios de cultura a utilizar quer para a conservação, isolamento, identificação ou contagem microbiológica.

De forma geral, os meios contêm compostos essenciais para o crescimento microbiológico como nutrientes e fatores de crescimento, sendo que cada meio terá particularidades mais adequadas aos MO para os quais foi concebido.

Em resumo, são utilizados meios de isolamento que permitem a obtenção de culturas puras com recurso à técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície de um meio sólido. Isto é conseguido através de:

∴ meios basais onde crescem MO pouco exigentes – meio de Kliger;

∴ meios seletivos que ao conter substâncias inibidoras favorecem o crescimento de uns em detrimento de outros em amostra polimicrobiana – gelose de Hektoen (HEKT);

∴ meios diferenciais que possibilitam a distinção de MO presentes na amostra através da adição de substratos e observação do aspeto desigual das colónias – ChromID CPS elite (CPSE);

∴ meios que são simultaneamente seletivos e diferenciais – gelose de Chapman e gelose de MacConkey (MCK)

∴ meios enriquecidos sólidos para favorecimento de espécies de interesse que tenham uma concentração baixa na amostra e que sejam nutricionalmente exigentes, são meios basais adicionados de produtos biológicos ricos em nutrientes como o sangue, soro ou ovo – gelose de sangue, gelose de chocolate.

∴ meios líquidos de enriquecimento cujo objetivo é favorecer o crescimento de determinados MO relativamente a outros. Após o enriquecimento, é feita a passagem para meio sólido adequado e de modo a obter culturas puras – caldo de Todd Hewitt + antibióticos (TODDH-T).

A Tabela 10 elucida quanto aos meios mais utilizados. A fim de proporcionar as condições adequadas de crescimento existem estufas com controlo de temperatura a 35±2°C, jarros Gaspak com recurso a vela e saquetas isoladoras para a colocação de geradores de atmosfera, apropriados à criação de atmosfera anaeróbia (ausência de O_2), microaerófila (5 a 10% de O_2) e capnofílica (3 a 10% de CO_2).[44]

Tabela 10 – Meios de cultura utilizados no GSSLC.

Meios Líquidos	
Caldo Todd-Hewit + Antibióticos TODDH-T	Meio de enriquecimento e isolamento seletivo de *Streptococcus* do Grupo B de Lancefield. Antibióticos como gentamicina e ácido nalidíxico inibem crescimento de Gr-.
Caldo Selenito	Meio de enriquecimento e isolamento seletivo que, ao inibir bactérias de Gr+ e algumas de Gr-, permite o crescimento dos géneros *Salmonella* spp. e *Shigella* spp
Caldo Cérebro-coração BHI-T	Meio de enriquecimento para crescimento de várias bactérias, fungos e leveduras. Especialmente adaptado para microrganismos aeróbios exigentes.
Meios Sólidos	
Gelose de MacConkey MCK	Meio de isolamento seletivo e diferencial de *Enterobacteriaceae,* incluindo *Escherichia coli.* Sais biliares e cristal violeta inibem Gr+. Deteção da fermentação da lactose.
Gelose de Hektoen HEKT	Meio de isolamento seletivo e diferencial de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. a partir de amostras de fezes. Sais biliares, azul de bromotimol e fucsina ácida inibem Gr+. Deteção da fermentação da lactose, sacarose e salicina. Deteção de formação de H_2S.
Gelose de Manitol Salgado MSA2	Meio de isolamento seletivo e diferencial de *Staphylococcus* spp. e orientação da identificação de *Staphylococcus aureus.* Presença de cloreto de sódio inibe a maioria dos Gr- e Gr+. Deteção da fermentação do manitol.

Meios Sólidos	
Gelose de Chocolate PoliVitex PVX	Meio de isolamento para a recuperação de *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. e *Streptococcus pneumoniae* (microrganismos fastidiosos). Contém Fator X e Fator V.
Gelose de Chocolate PoliVitex + VCAT3 VCA3	Meio de isolamento seletivo de Neisseria gonorrhoeae e Neisseria meningitidis. Contém Factor X e Factor V. Presença de antimicrobianos e antifúngicos inibe vários microrganismos.
Gelose de Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 SGC2	Meio de isolamento seletivo de leveduras e fungos filamentosos. Presença de gentamicina, cloranfenicol e pH ácido inibe a maioria dos Gr+ e Gr-.
Gelose de Columbia + 5% de Sangue de Carneiro COS	Meio de isolamento e recuperação de microrganismos exigentes. Deteção de hemólise.
Gelose ChromID CPS Elite CPSE	Meio de isolamento cromogéneo, identificação presuntiva e contagem de microrganismos presentes na urina.
Gelose de Columbia ANC + 5% Sangue de Carneiro CNA	Meio de isolamento seletivo de Gr+, especialmente para o crescimento de estafilococos e estreptococos. Adequado para bactérias fastidiosas. Ácido nalidíxico e colimicina inibem Gr-. Deteção de hemólise.
Meio de Löwenstein-Jensen LJ-T	Meio de isolamento seletivo de *Mycobacterium* spp. Inibição bacteriana pelo verde de malaquite.
Gelose Seletiva para Campylobacter CASA	Meio de isolamento seletivo e cromogéneo de *Campylobacter* spp. em amostra de fezes.
Gelose de Granada GRAN	Meio de isolamento seletivo e cromogéneo de *Streptococcus agalactiae* a partir de amostras vaginal e anal. Deteção e identificação presuntiva.
Gelose de Chocolate de Haemophilus 2 HAEM	Isolamento seletivo de *Haemophilus* spp. em amostras do trato urinário e respiratório. Contém Fator V e Fator X. Antimicrobianos e antifúngicos inibem outros microrganismos.
Gelose de Mueller Hinton E MHE	Meio para estudo da suscetibilidade antimicrobiana por difusão através de discos ou de E-test.
Gelose de Mueller Hinton + 5% de sangue de cavalo +20 mg/L β-NAD MHF	Meio para estudo da suscetibilidade antimicrobiana por difusão através de discos ou de E-test. Microrganismos fastidiosos como alguns estreptococos, *Haemophilus* spp. e *Moraxella* spp.

Gr-= Gram negativo; Gr+= Gram positivo;

7.3. Identificação microbiana e testes de sensibilidade antimicrobiana

Após a obtenção de culturas puras num isolamento bem-sucedido dos MO de interesse estamos aptos a proceder à sua identificação e aos respetivos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA). A identificação das espécies apoia-se nas suas características morfológicas, culturais, bioquímicas e antigénicas ao passo que os TSA baseiam-se nos padrões de inibição e resistência aos antimicrobianos.

As metodologias a utilizar vão depender dos achados microscópicos e culturais, assim como da valorização clínica das estirpes isoladas consoante o local anatómico e critérios patológicos associados. Seguidamente, realiza-se o TSA que é especialmente importante nos casos em que a suscetibilidade para dado MO não é previsível, quando a espécie é capaz de exibir resistências ou em patologia grave e recidivante.[45]

7.3.1. Provas complementares de diagnóstico

Apesar da crescente automatização dos processos, algumas provas de carácter mais manual contribuem ainda para a identificação dos MO. Os procedimentos mais comuns na rotina do setor encontram-se a seguir descritos.

∴ Pesquisa de catalase: utilizada na identificação de cocos de Gr+, mais precisamente para a distinção entre os géneros de *Staphylococcus* e *Streptococcus*. As bactérias que possuem a enzima catalase são capazes de consumir os peróxidos formados nas suas reações de oxidação metabólicas, convertendo-os em O_2 e água[46]. Em lâmina, coloca-se uma colónia isolada em contacto com H_2O_2. Se ocorrer efervescência – libertação de O_2 – a bactéria é catalase positiva, se não ocorrer a formação de bolhas a prova é negativa. Os estreptococos são catalase negativos enquanto os estafilococos são catalase positivos.

∴ Teste da oxidase: algumas bactérias possuem a enzima citocromo oxidase que catalisa o último passo da cadeia respiratória através da oxidação do citocromo c[47]. Na presença do citocromo c oxidado e da enzima citocromo oxidase, o composto tetrametil-p-fenilenodiamina da tira reagente é oxidado, observando-se o desenvolvimento de uma coloração azul-roxo escura para as colónias oxidase positivas. Bactérias dos géneros *Pseudomonas* e *Neisseria* são oxidase positivas, enquanto as Enterobacterias são tipicamente oxidase negativas.

∴ Prova da filamentação ou blastese: *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* são espécies dimórficas, apresentando-se nas formas leveduriforme ou filamentosa consoante condições de crescimento como a temperatura e acesso nutricional[48]. O procedimento é inocular uma colónia pura em 0,5mL de soro humano fresco. As leveduras destas espécies são capazes de emitir tubos germinativos, sem constrição (Figura 17), quando incubadas a 37°C entre 2 a 3h.

∴ Prova de sensibilidade à optoquina: *Streptococcus pneumoniae* é sensível ao antibiótico optoquina em baixas concentrações, enquanto os restantes *Streptococcus* spp. alfa-hemolíticos são resistentes[49]. Para a realização desta prova, uma suspensão de uma colónia pura em soro fisiológico com densidade de 0,5 na escala de McFarland é inoculada em gelose de Mueller-Hinton onde é colocado um disco de difusão de optoquina 0,5µg. Aguarda-se o crescimento bacteriano (18 a 24h), em atmosfera capnofílica a 35±2°C, e mede-se o respetivo halo de inibição. A amostra será positiva para *S. pneumoniae* caso o halo≥14mm.

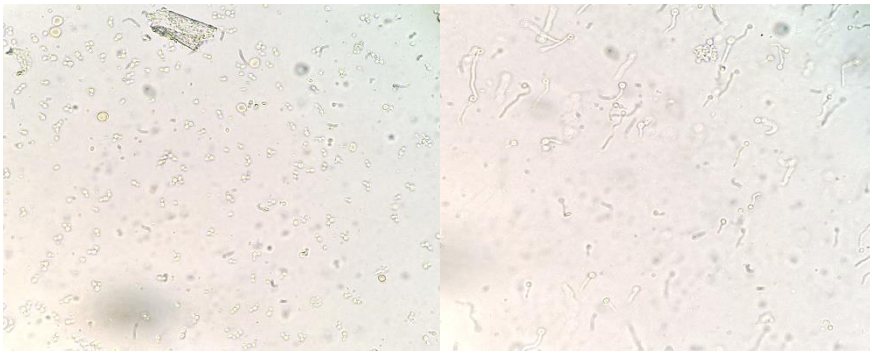


Figura 17 – Visualização microscópica da prova da blastese.
Presença de filamentação à direita e ausência à esquerda.

7.3.2. Métodos automatizados

Os métodos utilizados para a identificação e TSA das estirpes microbianas são na sua maioria os automatizados, permitindo a obtenção de um diagnóstico definitivo, rápido e seguro, complementado pelo auxílio ao clínico na escolha da antibioterapia mais adequada ao doente. Em consequência, um tratamento eficaz e introduzido nas fases mais iniciais da patologia conduzirá ao melhor prognóstico. O advento da automatização na microbiologia reveste-se da maior importância já que as amostras processadas pelos métodos clássicos levariam dias para serem conhecidos os seus resultados[50].

Após o apoio na identificação conferido pelas fases anteriormente descritas, o departamento conta com três equipamentos para prosseguir a identificação microbiana e o TSA. A distribuição das amostras a analisar é realizada consoante as necessidades associadas a cada amostra à luz das características dos equipamentos.

7.3.2.1. Vitek® 2 XL

O Vitek® 2 XL da BioMérieux executa a identificação de bactérias e leveduras, os respetivos TSA e deteta ainda os potenciais mecanismos de resistência destes MO. O equipamento é amplamente utilizado e a primeira escolha para confirmar a identificação de *Escherishia coli* após exames microscópico e cultural apontando a sua presença.

Para a identificação e TSA utilizam-se cartas da casa comercial constituídas por micropoços contendo substratos necessários à identificação (Tabela 11) ou agentes antimicrobianos em concentrações definidas – cartas de TSA. A partir dos achados obtidos anteriormente devem-se escolher as cartas corretas, sendo que cada carta reúne os substratos e os antimicrobianos adequados para cada tipo de MO a testar.

Tabela 11 – Cartas de identificação microbiana utilizadas no setor da Microbiologia.

Identificação microbiana		
Nomenclatura das Cartas	**Densidade**	**Aplicação**
GP ID	0,50 – 0,63	Identificação de bactérias de Gram positivo
GN ID	0,50 – 0,63	Identificação de bactérias de Gram negativo
YST ID	1,80 – 2,20	Identificação de leveduras

Os fatores avaliados para identificar os MO são as fontes de carbono e nitrogénio utilizadas e a atividade enzimática enquanto os TSA são obtidos através da capacidade de inibição de crescimento na presença de antimicrobianos e pela determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI).

Partindo do MO isolado, o procedimento inicia-se com a preparação de uma suspensão do inóculo em 2,5mL de uma solução de cloreto de sódio a 0,45%, que deve ser ajustada a uma determinada densidade da escala de McFarland com o auxílio de densitómetro. Contaminações podem ocorrer sobretudo aqui, já que as cartas são seladas.

A leitura das cartas de identificação é obtida por fluorescência e a leitura das cartas de TSA por turbidimetria. O sistema informático combina os resultados obtidos das CMIs com os VR das normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), classificando as estirpes como sensíveis, intermédias ou resistentes. Ademais, o *Advanced Expert System*™ implementado valida os resultados automaticamente e afere quanto a possíveis incongruências entre o TSA resultante e o MO identificado, proporcionando um perfil fenotípico preciso de resistências.[51]

7.3.2.2. Vitek® MS

O Vitek® MS é um equipamento cuja função é a identificação microbiana sendo a sua metodologia de análise a espetrometria de massa com recurso a tecnologia de dessorção e ionização por laser e assistida por matriz, e na qual se mede o tempo que os iões, depois de acelerados, demoram a chegar ao detetor – o chamado *time of flight*[52].

A deteção e identificação de proteínas por determinação do peso molecular de fragmentos específicos, únicos e representativos de um dado MO[52,53], assim como a associação a algoritmos de análise de dados informatizados culminam numa identificação rápida e muito fiável das espécies.

Na prática, o equipamento faz a deteção de biomarcadores de espécie[53] aquando da incidência do laser nas amostras, que ioniza o seu material proteico. Uma corrente elétrica acelera os iões resultantes, sendo feito o registo do seu tempo de chegada ao detetor e de

onde resultam espetros que representam o perfil proteico característico de cada MO[52]. Ao resultado obtido é atribuído um valor de confiança dado através da correspondência da comparação com os espetros da base de dados.[54]

Um dispositivo de ponta descartável é usado para colocar uma pequena quantidade de inóculo puro num dos 48 poços da cassete de análise, ao qual se junta 0,5µL da solução matriz. A estirpe de referência *Escherichia coli* K12 (genótipo GM48) é usada como estirpe padrão de calibração e CQ da identificação, pelo que é colocada em poços específicos da cassete. Quando a cassete tem os poços de amostra e de referência completos, deve-se deixar secar ao ar antes da sua inserção no equipamento.

Uma vantagem clara da implementação deste equipamento é a redução do *turnaround time* para a obtenção de resultados, fazendo dele a escolha óbvia quando uma identificação microbiológica é urgente.

Os resultados obtidos pelo Vitek® MS e pelo Vitek® 2 XL são combinados numa base de dados única da BioMérieux, o Myla®, que fornece relatórios em tempo real e integra a identificação dos MO e TSA, mesmo que realizada em equipamentos diferentes.

7.3.2.3. MicroScan WalkAway 96 Plus

O WalkAway vem colmatar a elevada afluência de amostras, apoiando o fluxo laboratorial nas identificações, mas sobretudo nos TSAs. Este equipamento da Beckman Coulter tem como fundamento a avaliação do perfil bioquímico através da utilização de substratos de modo a obter a identificação do MO na amostra. Na mesma placa de 96 poços são dispostos os antimicrobianos e as suas diluições para aferir o perfil de inibição assim como obter as respetivas CMIs.

7.3.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos – técnica manual

Os antibiogramas ocorrem maioritariamente nos equipamentos acima descritos, porém, em situações em que não exista um painel de antimicrobianos definido automaticamente, como por exemplo nas amostras veterinárias, ou quando os resultados do TSA são inconsistentes, surge a necessidade de recorrer à técnica manual.

A realização do antibiograma compreende a escolha criteriosa dos antibióticos a testar para uma dada bactéria, à luz da patogenia e local anatómico da infeção. O método preconizado é o teste de Kirby-Bauer ou método de difusão em disco.

Partindo de colónias isoladas de uma cultura pura, faz-se uma suspensão em soro fisiológico com densidade de 0,5 na escala de McFarland, ajustando a concentração de inóculo com o auxílio do densitómetro. Com uma zaragatoa estéril e descartável procede-se à inoculação total e uniforme da gelose de Mueller-Hinton ou de Mueller-Hinton fastidioso, com recurso ao método da sementeira em tolha. O meio vai permitir tanto o crescimento bacteriano como a difusão dos antibióticos. Após a inoculação colocam-se os discos dos antibióticos com concentrações definidas na superfície da gelose, tendo o cuidado de os afastar adequadamente das paredes e uns dos outros. Devem-se de seguida proporcionar as condições ideias de crescimento de 35±2°C por 18 a 24h.

A difusão dos antibióticos cria um gradiente de concentração do disco para a periferia observando-se crescimento bacteriano até a bactéria encontrar uma dada concentração de antibiótico a partir da qual não consegue mais crescer – formação do halo de inibição. Mede-se rigorosamente o diâmetro limpo do halo de inibição em mm e determina-se a sensibilidade ou resistência com base nas tabelas do EUCAST.

As tiras E-test são outro método manual no qual podemos ler diretamente a CMI de um dado antibiótico – método quantitativo. As geloses e a sua preparação são idênticas, colocando-se uma tira de E-test por placa. Lê-se a CMI na base da elipse de inibição.[45]

7.3.4. Testes imunocromatográficos

As reações com fundamento imunológico aplicam-se à área da microbiologia na medida em que antigénios de um dado MO são pesquisados nas amostras biológicas ou, por outro lado, detetam-se anticorpos formados aquando da resposta imunológica do doente, ambos com vista ao diagnóstico de infeção por um determinado agente patogénico. De modo a atempar os resultados e providenciar um tratamento rápido estes testes de determinação qualitativa são muito utilizados, sendo técnicas simples e rápidas.

Os testes imunocromatográficos são realizados em cassetes onde o produto biológico líquido a testar é colocado no poço designado. A fase líquida percorre o filtro da cassete por difusão, onde encontra uma linha controlo e pelo menos uma linha teste. O teste é validado quando a linha de controlo é nítida. Os testes mais utilizados são os que se seguem:[55]

∴ Pha direto: é utilizado na pesquisa do antigénio de estreptococos do grupo A de Lancefield beta-hemolíticos, em amostra do exsudado tonsilar e parte posterior da faringe, sem tocar na úvula, colhida em zaragatoa seca. A sua requisição surge na suspeita de amigdalite bacteriana por este agente.

∴ Pesquisa de *Campylobacter jejuni e Campylobacter coli*: antigénio determinado em amostras de fezes ou da sua cultura, na presença de fezes diarreicas.

∴ Pesquisa de *Giardia lamblia*: deteção do antigénio do parasita em amostra de fezes.

∴ Pesquisa de produção de carbapenemases: deteção de cinco mecanismos de resistência, nomeadamente das Enterobactérias, a partir das suas culturas. Mutações genéticas originam estirpes com sensibilidade antibiótica diversa.

7.4. Marcha geral dos produtos biológicos

7.4.1. Urocultura

As infeções no trato urinário estão entre as infeções mais comuns no Homem, pelo que a urina é um dos produtos biológicos mais solicitados para o estudo microbiológico. A infeção aguda por via ascendente a partir da microbiota intestinal saprófita, que invade a uretra, é a principal causa da patologia. O agente etiológico mais frequente no indivíduo não imunocomprometido são as Enterobactérias, nomeadamente *Escherichia coli.*

A amostra preconizada é a primeira urina da manhã, colhendo o jato intermédio, também chamada de urina assética (anteriormente descrita). Em crianças incapazes de controlar a micção, deve-se realizar a colheita em saco coletor após a devida higienização.

A urina é homogeneizada e semeada diretamente em meio de cultura apropriado, com recurso a ansa calibrada de 10 µL, e de seguida incubado (aerobiose, 37°C, 24h). O meio utilizado é a gelose cromogénea ChromID CPS elite (CPSE) que, contendo substratos específicos, deteta atividades enzimáticas particulares ao conferir diferentes colorações às colónias. A cultura com crescimento positivo permite fazer a identificação presuntiva observando-se o aspeto das colónias e a quantificação através da densidade destas.

O laboratório identifica presuntivamente *Escherichia coli* – colónias com coloração rosa velho, normalmente pequenas e mucosas – fazendo a confirmação em equipamento automatizado e respetivo TSA.

No que concerne à quantificação, a urocultura é considerada positiva quando estão presentes um ou dois agentes patogénicos significativos e com uma densidade das colónias

$\geq 10^5$ unidades formadoras de colónia (UFC) por mL. Aquando resultados entre 10^3 e 10^5 UFC/mL, a informação é reportada ao clínico que valoriza a infeção à luz dos sintomas associados. Crescimento $<10^2$ UFC/mL é considerado como urocultura negativa, na qual houve contaminação pela microbiota local aquando da colheita, normalmente acompanhada por elevada quantidade de células epiteliais no sedimento urinário. Culturas com três ou mais MO foram também provavelmente alvo de contaminação uma vez que as infeções urinárias têm raramente mais que um agente etiológico.

A fim de consolidar as informações dadas pela urocultura devem-se consultar os resultados obtidos na análise da sumária de urina, especialmente os de pesquisa de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, bactérias, leveduras e parasitas.[56]

7.4.2. Exsudado vaginal

Os exsudados genitais permitem a pesquisa de doenças sexualmente transmissíveis e de outras patologias causadas por MO. A microbiota vaginal é abundante, proporcionando um ambiente hostil à invasão e colonização por agentes patogénicos e oportunistas. Para isto contribui tanto a ocupação por *Lactobacillus* como o seu metabolismo anaeróbio do qual resulta o ácido láctico que mantém o pH vaginal ácido, frequentemente abaixo dos 4,5.

A colheita deve ser executada do exsudado das paredes vaginais e em zaragatoa em meio de carvão de modo a garantir a sobrevivência de *Neisseria* spp. e destinada ao exame cultural, e em zaragatoa seca para o esfregaço a visualizar no exame microscópico.

O exame microscópico é realizado a fresco e através da coloração de Gram. O exame a fresco de amostras recentes é especialmente importante no diagnóstico de *Trichomonas vaginalis* pois a observação do movimento característico do trofozoíto permite o diagnóstico. Este parasita é um protozoário flagelado responsável por infeções sintomáticas na mulher (vaginites e cervicites).

A coloração de Gram permite observar a microbiota bacteriana predominante e a sua morfologia. A lâmina corada é especialmente útil para a identificação das "*clue cells*", células epiteliais de contornos difusos pois estão recobertas de bactérias de Gr-. *Gardenerella vaginalis* é a espécie mais frequentemente encontrada que, em conjunto com os sintomas característicos como o aspeto acinzentado e odor do corrimento, que é abundante, auxiliam o clínico no diagnóstico de vaginose bacteriana[57]. A coloração facilita também a observação dos bacilos *Döderlein* ou *Lactobacillus* spp., que devem ser abundantes, fisiologicamente, e que no desequilíbrio da microbiota estão diminuídos.

Numa primeira fase para o exame cultural cultivam-se as geloses de sangue de Columbia enriquecida com 5% de sangue de carneiro (COS) (CO_2, 37°C, 24 a 48h). Este meio permite que bactérias exigentes e fastidiosas cresçam, assim como possibilita a visualização do fenómeno hemolítico efetuado por alguns agentes que lisam os eritrócitos presentes, descolorando a gelose ao redor das suas colónias. Cultiva-se ainda em meio seletivo para o isolamento de leveduras e fungos filamentosos, complementado com substâncias inibidoras do crescimento bacteriano: a gelose de Sabouraud com gentamicina e cloranfenicol 2 (SGC2) (aerobiose, 37°C, 24h). Resultados destes procedimentos indicam a trajetória diagnóstica a prosseguir ou o resultado a dar, à luz da valorização em conjunto com os dados do exame microscópico.

O cultivo em gelose de SGC2 revela muitas vezes, quando o crescimento é positivo, a presença de pequenas colónias mucosas e brancas. Assim sendo, procede-se à prova de filamentação para averiguar a presença de *Candida albicans*. Se positiva, o diagnóstico é definitivo, se negativa, dever-se-á seguir com a identificação em equipamento automatizado da levedura em questão.

Na pesquisa orientada de *Neisseria gonorrhoeae* cultiva-se o exsudato em gelose de chocolate PolyViteX (PVX) + VCAT3. O meio de PVX contém nicotinamida adenina di-nucleótido (NAD/fator V) e hemina (fator X), fatores de crescimento essenciais para esta espécie. Adicionalmente, a designação VCAT3 faz referência à presença de antimicrobianos e antifúngicos que proporcionam um aumento de seletividade do meio para que este MO fastidioso possa crescer em detrimento de outros numa amostra intrinsecamente polimicrobina. Colónias pequenas e transparentes após o primeiro dia de incubação (CO_2, 37°C), que se tornam mais opacas e maiores com o aumento do tempo para o crescimento denunciam uma possível positividade. A visualização microscópica com coloração de Gram revela diplococos de Gr- com morfologia característica e teste da oxidase e catalase positivos.[58]

7.4.2.1. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

A pesquisa de *Streptococcus agalactiae* do grupo B de Lancefield, cocos de Gr+, é realizada em grávidas aquando das 35 a 37 semanas de gestação através da colheita em zaragatoa do exsudado vaginal e retal, ambas em meio de transporte de Amies/Stuart. Esta análise prende-se com o facto de a infeção no recém-nascido poder ter lugar no momento do

parto e respetiva passagem pelo canal vaginal colonizado, contactando também com a microbiota retal.

Visto que a presença deste MO é assintomática e relativamente comum na idade adulta, a sua pesquisa no pré-natal é obrigatória pois nos recém-nascidos apresenta-se como uma infeção grave que pode culminar em meningite, pneumonia ou sepsis. Assim, em mulheres grávidas que testem positivo, deve fazer-se uma antibioterapia intraparto como profilaxia da transmissão materna ao feto.[59]

O procedimento inicia-se com a inoculação das duas zaragatoas no mesmo meio de enriquecimento de TODDH-T, meio este desenhado para o crescimento rápido e seletivo de bactérias fastidiosas do género *Streptococcus* (aerobiose, 37°C, 24h).

Figura 18 – Gelose cromogénea de Granada apresentando colónias laranja – identificação presuntiva de *Streptococcus agalactiae*.

No dia seguinte, 10 µL do caldo de enriquecimento, deslocados em ansa graduada, são semeados no meio sólido de Granada™. Esta gelose é um meio cromogéneo seletivo para a pesquisa e identificação direta de estreptococos do grupo B, em que as colónias positivas têm coloração laranja (Figura 18). A gelose é semeada (CO_2, a 37°C, 48h), sendo as placas observadas às 24h de incubação de modo a antecipar a libertação de resultados de amostras francamente positivas. Às 48h são lançados os resultados definitivos, quer positivos, quer negativos. As colónias positivas apresentam a coloração laranja devido à produção de fosfatase, enquanto outras bactérias potencialmente presentes hidrolisam substratos adicionais, adquirindo coloração azul, verde, branca ou transparente.

7.5.3. Exsudado uretral

A inflamação da uretra ou uretrite é uma infeção do trato urinário inferior, mais comum nos homens, e que está fortemente associada à presença de doenças sexualmente transmissíveis embora possam também ocorrer por trauma mecânico ou fatores que provoquem irritação local. Os MO mais comuns são *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, surgindo também casos associados à presença de *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, Herpes simplex vírus e Adenovírus[58,60].

Um dos sintomas mais comuns é a descarga uretral purulenta. Quer esteja presente ou não, a colheita deve ser realizada com recurso a zaragatoa estéril antes da primeira micção

ou 1h após a última. Deve-se limpar a mucosa circundante com gaze esterilizada e introduzir zaragatoa flexível e fina na uretra a cerca de 1cm de profundidade com movimento de rotação. Para o exame microscópico é necessária colheita em zaragatoa seca e para o exame cultural a amostra deve ser colhida para meio de transporte contendo carvão, a fim de viabilizar o cultivo de *Neisseria gonorrhoeae.*

O exame microscópico a fresco segue os mesmos pressupostos descritos para o exsudado vaginal no que toca à pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. A lâmina corada com Gram auxilia na visualização de leucócitos, bactérias, células, eritrócitos e elementos leveduriformes. A observação de diplococos intracelulares de Gr- no homem fazem diagnóstico definitivo de *Neisseria gonorrhoeae*, todavia na mulher o exame microscópico tem fraca sensibilidade[60].

Para o exame cultural semeia-se a gelose de PVX + VCAT3 (CO_2, 37°C, 24h a 48h) também para a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae.* No caso de o exame microscópico revelar elementos leveduriformes, deve-se proceder ao cultivo em gelose de SCG2.

7.5.3.1. Pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*

Mycoplasma hominis e *Ureaplasma urealyticum* são micobactérias comensais dos tratos genito-urinários. No entanto, a sua proliferação pode desencadear um processo infecioso, estando associadas a patologias como a uretrite ou o aborto espontâneo[61,62]. A pesquisa destes agentes etiológicos a partir da zaragatoa uretral seca é realizada com recurso à galeria de identificação Mycoplasma IST2 da BioMérieux, que combina a deteção destas duas espécies, a sua semi-quantificação e o respetivo TSA, num único passo.

A zaragatoa é inoculada no reagente fornecido que é posteriormente dispensado nas cúpulas da galeria. Cada cúpula é recoberta com parafina para possibilitar as reações que ocorrem em anaerobiose (37°C, 48h). A leitura da galeria é colorimétrica e de fácil interpretação, tendo os testes negativos coloração amarela e os positivos coloração laranja a vermelho (Figura 19).

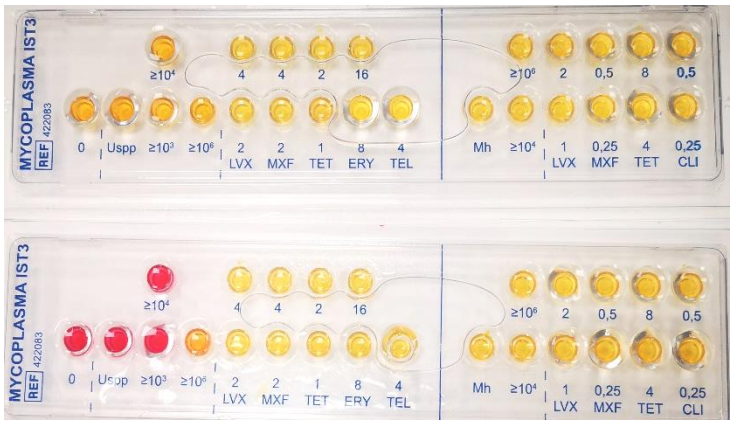


Figura 19 - Galeria de identificação Mycoplasma IST2. Em cima, pesquisa negativa; em baixo, identificação presuntiva de *Mycoplasma hominis.*

7.5.4. Exsudados do trato respiratório superior

O sistema respiratório tem a nobre função de assegurar as trocas gasosas, garantindo assim a sobrevivência. As afeções deste trato, que vai desde a cavidade nasal ou orofaringe até aos pulmões, possuem gravidade variável, porém infeções graves têm um impacto importante na morbilidade e mortalidade das populações[63].

Inúmeros fatores formam em conjunto uma barreira à infeção tal como a presença de muco e pêlos nasais, secreção de diversos produtos com atividade antimicrobiana como a IgA ou lisozima, ou a colonização por microbiota protetora[64].

Devido aos diferentes nichos de agentes que habitam cada localização anatómica do trato[64], a colheita deve ser realizada nas regiões anatómicas devidas, evitando contaminação e sendo representativa da diversidade nesse tecido específico.

No entanto, a valorização da infeção deve ser realizada à luz de diversos fatores como a idade, estado clínico e imunológico do doente já que o isolamento de alguns MO pode representar uma colonização e não uma infeção. Com efeito, algumas espécies, quando presentes, são sempre patogénicas, como *Mycobacterium tuberculosis,* enquanto outras, como *Streptococcus pneumoniae,* podem ser potencialmente patogénicas, pelo que cada situação carece de avaliação individualizada.

A fisiopatologia da infeção do trato respiratório superior inicia-se por contato direto com superfícies e objetos contaminados ou por emissão de aerossóis, sendo a faringite a infeção mais comum, seguindo-se a laringite, epiglotite, sinusite, otites média e externa, a angina/amigdalite e tosse convulsa. Os MO mais comuns são: *Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Moraxella catarrhalis, Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis.*[63]

O exsudado orofaríngeo é colhido em zaragatoa com meio de Stuart. De forma a assegurar a ausência de contaminação pelas estruturas adjacentes e pela saliva, o doente deve abrir bem a boca e a sua língua deve ser deprimida com a ajuda de uma espátula, passando a zaragatoa vigorosamente na zona visivelmente inflamada ao nível das amígdalas e porção posterior da faringe sem tocar na língua, úvula e mucosas laterais.

O exame microscópico é dispensável já que a microbiota é abundante, impossibilitando a valorização dos achados. O material biológico é então semeado em gelose de Columbia CNA + 5% de sangue de carneiro (CNA) (CO2, 37°C, 24 a 48h). O CNA é um meio seletivo utilizado para o isolamento de bactérias de Gr+, especialmente para o crescimento de estafilococos e estreptococos. O sangue de carneiro permite a deteção de reações hemolíticas como acontece na presença de *Streptococcus pyogenes*, bactéria que é a causa mais comum de

faringite, para além dos agentes virais, e que realiza β-hemólise, deixando zonas claras em redor ou debaixo das colónias que forma (Figura 20). Ademais, as colónias desta bactéria são caracteristicamente pequenas e de coloração branca a acinzentada. Não raras vezes, a requisição solicita o exame imunocromatográfico do Pha direto tanto como complemento como em substituição ao exame cultural.

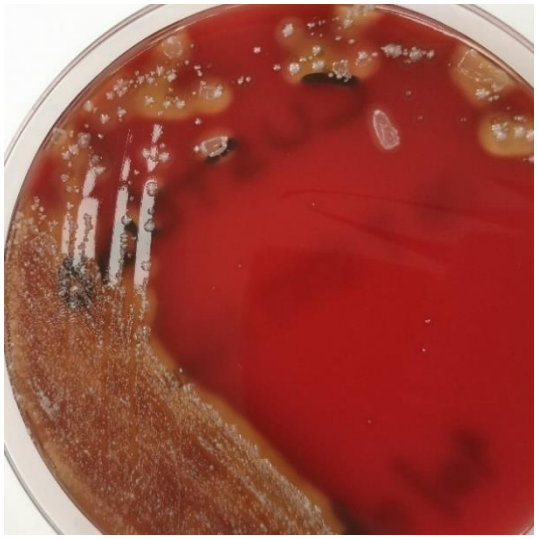


Figura 20 – Zaragatoa orofaríngea semeada em gelose de CNA – identificação presuntiva de *S. pyogenes.*

O exsudado nasal é colhido através da introdução da zaragatoa na fossa nasal até encontrar resistência da cartilagem, rodando-a suavemente contra a mucosa nasal, e colocado em meio de transporte de Stuart. Tal como para o exsudado orofaríngeo, também aqui o exame microscópico está dispensado, fazendo-se apenas a sementeira em COS (aerobiose, 37°C, 24 a 48h). Deve-se verificar a eventual presença de hemólise e realizar os testes complementares de identificação aplicáveis. A amostra é também utilizada para o diagnóstico da infeção pelo vírus SARS-CoV-2, sendo a técnica realizada no departamento de biologia molecular através do método da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase – RT-PCR.

O exsudado auricular na presença de otite externa e média é colhido em zaragatoa estéril e transportado em meio de Stuart. Na presença de pus deve-se cultivar primeiramente em meio líquido de enriquecimento de caldo cérebro-coração (BHI). Realiza-se o cultivo da gelose de CNA para averiguar a presença de *Streptococcus pneumoniae*, que apresenta α-hemólise, e de *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, ambas com β-hemólise. Na gelose de PVX pesquisa-se etiologia infeciosa por *Haemophilus influenzae*, muito prevalente na infeção deste tecido. Finalmente, em gelose MCK, procuram-se agentes etiológicos menos comuns como sendo as bactérias de Gr- *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Proteus mirabilis* que têm alguma expressão na otite externa crónica, por exemplo. Os meios de CNA e PVX incubam-se em atmosfera capnofílica (37°C, 24 a 48h) e o de MCK em aerobiose (37°C, 24h).

7.4.5. Expetoração, secreções e lavados brônquicos

O trato respiratório inferior, que se inicia na laringe abaixo das cordas vocais e se prolonga até aos alvéolos pulmonares[64] pode contrair infeção através da inalação de aerossóis contendo MO que invadem o trato respiratório superior, superando as suas barreiras à infeção, por aspiração acidental do conteúdo oral ou gástrico e menos frequentemente por difusão hematogénea.

As patologias mais comuns são a bronquite, bronquiolite, pneumonia adquirida na comunidade ou nosocomial, por aspiração, crónica e empiema. A etiologia viral tem um grande peso nas afeções dos brônquios e na pneumonia da comunidade em crianças, assim como a pneumonia crónica se deve muitas vezes à presença de micobactérias e fungos. A valorização dos achados microbiológicos deve ser sempre realizada no âmbito da história clínica do doente assegurando que o elevado potencial de contaminação pela microbiota da orofaringe não interfere nos resultados.[63]

Para garantir que o grau de contaminação das amostras é mínimo, a colheita é um passo crucial para o sucesso analítico. A expetoração é o produto biológico mais solicitado devido à maior facilidade na sua obtenção, tendo no entanto maior risco de contaminação. Deve ser colhida a primeira expetoração da manhã após gargarejar e realizar higiene oral com água e através de tosse profunda, evitando-se saliva.

Todavia, uma avaliação macroscópica e microscópica da amostra deve ser levada a cabo pelo técnico pois amostras sem qualidade devem ser desprezadas, dando lugar à repetição de colheita. A avaliação da qualidade microscópica passa por observar uma lâmina do esfregaço da expetoração corada com Gram, com objetiva de 10x, e fazer a contagem de células epiteliais e de leucócitos, segundo os critérios de Murray e Washington. Uma boa amostra deverá ter poucas células epiteliais (<25 células/campo de observação), e maior número de leucócitos (>25) para ser considerada uma amostra representativa do sistema respiratório inferior[65]. Outras amostras menos suscetíveis à contaminação das vias respiratórias superiores são as secreções brônquicas, obtidas por aspiração e os lavados brônquicos colhidos por broncoscopia ou biópsia do pulmão.

O exame microscópico realiza-se através da lâmina corada com Gram obtida por estiramento e através da seleção de uma porção purulenta da amostra. Seguidamente à avaliação da qualidade anteriormente referida, prossegue-se com a observação da morfologia bacteriana presente e determinação das formas predominantes. Esta avaliação auxilia a conduzir o restante processo de identificação, especialmente nas situações menos comuns como é o caso da infeção por fungos.

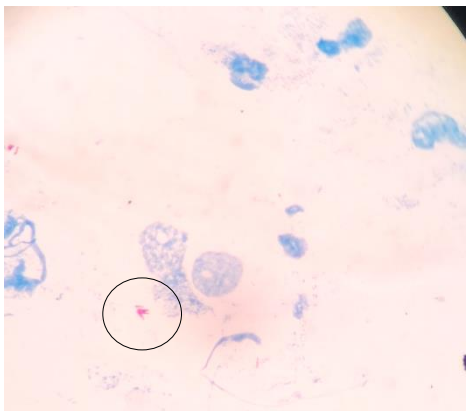


Figura 21 – Esfregaço em lâmina de amostra de expetoração denotando presença de bacilos corados de vermelho – bacilos ácido-álcool resistentes.

Adicionalmente, o laboratório preconiza a realização de uma lâmina corada com a coloração de Ziehl-Neelsen para despiste de infeção por bacilos ácido-álcool resistentes. A tuberculose, resultante da infeção por *Mycobacterium tuberculosis* é um importante problema mundial de saúde pública devido à sua habilidade em estabelecer infeção crónica na forma de pneumonia e cuja incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos.

As bactérias do género *Mycobacterium* são ricas em ácidos micólicos que tornam as suas paredes pouco permeáveis às colorações usuais[63]. Sujeitando as amostras ao calor e a uma solução corante fenolada, os bacilos ácido-álcool resistentes adquirem a coloração vermelha (Figura 21). Seguidamente, a lâmina é descolorada pela ação do álcool e ácido, mas os bacilos de *Mycobacterium* spp. não perdem a coloração. Os restantes elementos celulares são posteriormente corados pelo azul de metileno.

Caso a pesquisa seja positiva ou haja uma requisição direta pelo clínico, prossegue-se com a pesquisa cultural em meio de Löwenstein-Jensen que, através da adição do verde de malaquite, faz a seleção do crescimento das micobactérias em detrimento da restante microbiota comensal. A incubação é realizada por 60 dias (aerobiose, 37°C) pois o seu crescimento é lento, resultando em colónias com aspeto de couve-flor.

O exame cultural passa por semear as geloses de COS (CO_2, 37°C, 48h), MCK (aerobiose, 37°C, 24 a 48h) e gelose de chocolate *Haemophilus* 2 (HAEM) (CO_2, 37°C, 24 a 48h). A sementeira em COS é realizada colocando um disco de difusão de optoquina, antibiótico que inibe seletivamente o crescimento de *Streptococcus pneumoniae,* permitindo assim o seu diagnóstico presuntivo. Nesta gelose deve-se ainda atentar a presença de hemólise, podendo uma α-hemólise indicar suspeita de infeção por *Sreptococcus pneumoniae*, enquanto a β-hemólise é característica de *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (Figura 22).

Figura 22 – Cultura em COS de lavado bronco-alveolar com presença de *Staphylococcus aureus* – β-hemólise.

A gelose HAEM é seletiva para o crescimento e isolamento de *Haemophilus influenzae,* um dos agentes etiológicos mais comuns da patologia infeciosa respiratória. *Haemophilus influenzae* é um bacilo de Gr- fastidioso que necessita de fatores estimulantes do crescimento, sendo eles O fator V e o fator X, que estão presentes no meio de HAEM.

A seletividade do meio permite o seu crescimento em detrimento da restante microbiota presente na amostra – fator da maior relevância já que em outros meios o seu crescimento é muitas vezes obscurecido pelas restantes estirpes.

O cultivo de gelose de MCK tem como objetivo o isolamento de bacilos aeróbios de Gr-, também uma fonte importante da infeção.

7.5.6. Exames cutâneos

A pele é a primeira linha de defesa do Homem. A sua capacidade protetora advém de inúmeros fatores químicos e físicos, em muito devidos à forte colonização por bactérias, fungos e vírus residentes à sua superfície. A quebra da sua integridade por trauma, ulceração ou inflamação leva ao desequilíbrio da microbiota e permite que os agentes patogénicos consigam ter acesso a uma porta de entrada, invadindo e proliferando nos tecidos, o que leva ao estabelecimento do processo infecioso.

As afeções da pele podem ter origem em processos primários, secundários a dano pré-existente ou manifestações de etiologia sistémica, pelo que a avaliação individualizada da história clínica, do estado imunológico e da localização anatómica e modo de colheita são crucias para a correta valorização dos achados laboratoriais.[66]

O exsudado de feridas e pus é colhido em zaragatoa estéril seca para o exame microscópico, e transportado em meio de Stuart para o exame cultural. O exame microscópico recorre à coloração de Gram e pode constituir um elemento de diagnóstico importante ao permitir a visualização da morfologia predominante e, portanto, a realização de um diagnóstico presuntivo. Ademais, proporciona a visualização de células inflamatórias e é uma ferramenta útil na pesquisa de MO anaeróbios.

O exame cultural nas geloses de CNA (CO_2, 37°C, 48h) e MCK (aerobiose, 37°C, 24h) serve a pesquisa das bactérias mais frequentemente presentes nas lesões cutâneas. *Staphylococcus aureus* e *Sreptococcus pyogenes* crescem no meio de CNA, demonstrando atividade β-hemolítica, sendo que o meio apoia o crescimento de outras bactérias de Gr+ eventualmente presentes. A gelose de MCK isola seletivamente bactérias de Gr-.

Nas feridas antigas há dano nas estruturas mais profundas nas quais a presença de anaeróbios aumenta. Amostras de lesões fechadas são colhidas através de aspiração ou punção com seringa. O exame microscópico é idêntico ao da zaragatoa de lesão superficial acima descrito, porém com a adição de esfregaço corado por Ziehl-Neelsen para averiguação de micobactérias. Todo o material purulento obtido por punção é inoculado em meio de

enriquecimento de BHI a 37°C. O exame cultural é realizado em duplicado, tanto a partir do material purulento não tratado como seguidamente ao crescimento bacteriano proporcionado pelo caldo de enriquecimento. Utilizam-se as geloses de PVX (anaerobiose, CO2, 37°C, 48h), CNA (CO_2, 37°C, 48h) e MCK (aerobiose, 37°C, 24h).

Este tipo de amostras são frequentemente polimicrobianas, pelo que se deve atentar à existência de infeções mistas com mais de um MO em multiplicação a causar dano, não descurando, no entanto, a elevada probabilidade de contaminação das amostras. O exame cultural deve ser interpretado à luz do exame microscópico e restantes dados clínicos, realizando o diagnóstico presuntivo ou seguindo a marcha de identificação com recurso a equipamento automatizado e/ou testes adicionais. O TSA deve ser realizado na presença de isolados com suscetibilidade variável.

No laboratório as análises micológicas são menos frequentes. Amostras de cabelos, fâneros e pele são avaliadas por exame microscópico, quando aplicável, como é o caso do diagnóstico de infeção por *Malassezia furfur* na pele, cuja morfologia ao microscópico perfaz o diagnóstico definitivo. As amostras são semeadas em SCG2 (aerobiose, 37°C, 24h), sendo realizada a identificação pela visualização ao microscópio da morfologia ou através dos equipamentos automatizados. O antifungigrama é realizado manualmente através de discos de difusão de antifúngicos ou num dos equipamentos disponíveis.

7.5.7. Coprocultura

As afeções intestinais são muito comuns na população e podem ter etiologia infeciosa ou ser fruto de terapêuticas farmacológicas, doença tumoral, síndromes de má absorção ou intolerância alimentar. Quando provocadas por MO, estes tanto podem ser bactérias como fungos, vírus ou parasitas que têm acesso à mucosa intestinal a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados. Por norma, o indivíduo imunocompetente apresenta um episódio autolimitado. No entanto, fatores como a infância e a velhice, um sistema imunitário debilitado, a toma de antibioterapia e o contacto com uma dose infetante elevada fragilizam a mucosa intestinal e contribuem para a manifestação sintomática grave, com possíveis implicações na morbilidade e mortalidade.

Deste modo, para a correta avaliação da infeção gastrointestinal e da intoxicação alimentar deve-se conhecer a história clínica do doente, avaliação clínica e farmacológica, o seu exame físico, historial de viagens, diário alimentar recente e possíveis contatos de risco

de transmissão fecal-oral. Isto permite direcionar o diagnóstico diante das várias causas possíveis, atendendo simultaneamente aos custos económicos inerentes.

Tal como nos tecidos abordados anteriormente, também o sistema digestivo possui características que atuam como uma barreira contra a infeção. Fatores químicos como o pH ácido gástrico, físicos como a presença de motilidade ou a colonização por uma densa microbiota comensal impedem a fixação de MO invasores. Contudo, através das suas propriedades invasoras, tóxicas, de emissão de toxinas ou de enfraquecimento da microbiota estes agentes iniciam um processo infecioso.[67]

A colheita das fezes deve ser realizada em três dias não consecutivos e colocada em recipiente estéril e bem fechado. Segmentos representativos da amostra onde macroscopicamente se evidencie a presença de sangue, muco, pus ou parasitas devem ser escolhidos para a análise pois denunciam muitas vezes a etiologia infeciosa. No exame macroscópico observa-se ainda a cor e consistência das fezes.

A atividade laboratorial inicia-se com a realização de uma suspensão do material fecal para visualização microscópica a fresco e com coloração de Gram. O exame a fresco permite ter uma ideia do estado do ecossistema intestinal microbiano, que fisiologicamente é rico em bacilos e detritos e numa infeção estabelecida fica visualmente empobrecido. A coloração de Gram permite constatar quanto à morfologia das bactérias predominantes, havendo normalmente uma proporção mais elevada de Gr-.

O exame cultural inicia-se com a inoculação de uma suspensão das fezes em MCK (aerobiose, 37°C, 24h) para a pesquisa de Enterobactérias e outras famílias de Gr-. Simultaneamente, realiza-se a inoculação do material fecal em caldo de enriquecimento de selenito (aerobiose, 37°C, 24h), um meio líquido de isolamento seletivo que, ao inibir bactérias de Gr+ e algumas de Gr-, permite o crescimento dos géneros *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., que se encontram nas fezes em quantidade diminuta. Pertencentes às *Enterobacteriaceae*, são o agente etiológico mais comum das diarreias infeciosas.

Após o tempo de incubação, o caldo de selenito é homogeneizado e semeado em gelose de HEKT (aerobiose, 37°C, 24h). O HEKT é um meio de isolamento seletivo e diferencial uma vez que possui sais biliares, azul de bromotimol e fucsina ácida que inibem o crescimento da maioria das bactérias de Gr+ e de algumas de Gr-, assim como açucares para averiguar a fermentação bacteriana (mudança de cor do meio de verde para salmão nas fermentadoras). As colónias de interesse de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. são não fermentadoras, pelo que as colónias que formam são azuis ou esverdeadas, sem alteração da

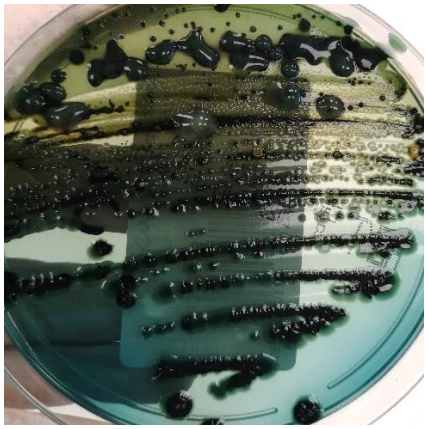


Figura 23 – Coprocultura em HEKT apresentando colónias com centro negro, típico de *Salmonella* spp.

cor do meio. Colónias com centro negro (Figura 23) também são valorizáveis uma vez que a formação de sulfureto de hidrogénio ocorre em *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Campylobacter* spp. é uma pesquisa orientada, que quando necessária é especificamente requisitada pelo clínico, não se incluindo na marcha geral da coprocultura. São bactérias imóveis de Gr- em forma de bastonetes curvos, em espiral ou em S, cuja pesquisa é da maior importância visto serem das causas mais frequentes de gastroenterites bacterianas, especialmente *Campylobacter jejuni*.

Uma suspensão das fezes é semeada na gelose seletiva de *Campylobacter*, um meio cromogéneo para o isolamento e enumeração das espécies do género, sendo outros MO inibidos através da presença de reagentes adicionados. As colónias de interesse (Figura 24) surgem com uma coloração vermelho-tijolo (microaerófilia, 37 ou 42°C, 24h a 48h), sendo os testes da oxidase e da catalase ambos positivos.

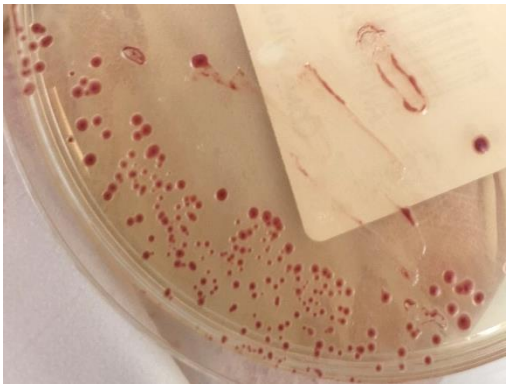


Figura 24 – Gelose seletiva de *Campylobacter* apresentando colónias vermelho-tijolo, típicas do género.

7.5.8. Exame parasitológico de fezes

As parasitoses acometem a espécie humana desde a sua origem com uma transmissão que está intimamente ligada aos costumes e comportamentos das populações. Os parasitas são maioritariamente zoonóticos, pelo que a disseminação ocorre do reservatório animal. Fatores como falta de condições de higiene, a inexistência de saneamento básico, práticas inadequadas de pecuária e agricultura, a globalização e as crescentes mudanças climáticas proporcionam o aumento da incidência de infeção[67,68].

A colheita para o exame aos parasitas deve ser realizada em 3 dias alternados, ao longo de 10. O exame macroscópico é efetuado à semelhança da coprocultura (averiguar presença sangue, pus ou muco), sendo que as formas parasitárias de maiores dimensões podem ser percetíveis ao olho nu.

O exame microscópico é indispensável na pesquisa de parasitas visto que o diagnóstico é realizado a partir da observação de estruturas parasitárias nas fezes como quistos, ovos, trofozoítos e larvas. Para tal, é efetuada a observação direta a fresco de uma suspensão de fezes para pesquisa das formas flageladas e amebas.

Seguidamente, é realizado um passo de concentração por sedimentação das estruturas parasitárias e eliminação dos detritos fecais através de um kit comercial. O método utilizado pelo kit é o método de Ritchie modificado em que o emprego de formalina a 10% conserva as estruturas parasitárias e o éter proporciona a separação entre o material fecal e as estruturas de interesse. Os tubos constantes do kit estão equipados com sistema de filtração para retenção das partículas maiores e consequente concentração das formas parasitárias no sedimento após centrifugação (1500 rpm, 10 minutos). Observa-se uma gota do sedimento juntamente com uma gota de soluto de lugol, com objetiva de 10x (pesquisa de ovos e larvas) e de 40x (pesquisa de quistos).

7.5.9. Hemocultura

A bacteriémia define-se como a presença de bactérias na corrente sanguínea, um tecido que é fisiologicamente estéril. Ocorre por introdução direta na circulação por processos invasivos ou por fonte extravascular, através de infeções não tratadas noutros locais, como é o caso de agentes que acedem à circulação após procedimentos dentários.

Situações autolimitadas e transitórias podem ocorrer, cessando rapidamente pela ação do sistema imunológico. Contudo, estados imunitários deficientes poderão dar aso ao estabelecimento de um processo infecioso, culminando na infeção de tecidos importantes como nos casos de meningite, endocardite ou pericardite ou em choque sético, com elevado comprometimento da sobrevivência.[69]

A colheita para hemocultura deve ser realizada em veia periférica, garantindo elevadas condições de assepsia de forma a evitar a contaminação pela microbiota cutânea, sendo sempre a primeira a colher de entre as análises cuja amostra seja o sangue. O volume de sangue a colher é definido pela casa comercial para adultos e crianças e este é distribuído entre os frascos de hemocultura da BD BACTEC™, aeróbio e lítico anaeróbio (Figura 25), meios enriquecidos que suportam o crescimento bacteriano a 37°C.

Diariamente, observa-se a turvação, hemólise, formação de película ou a formação de colónias nos fracos de hemocultura. Caso haja suspeita de positividade, é efetuado um

esfregaço com coloração de Gram do conteúdo da garrafa e a sua inoculação em gelose de COS (aeróbia, CO_2, 37°C, 24 a 48h), e PVX (microaerofila e anaeróbia, CO_2, 37°C, 24-48h). A observação do esfregaço permite observar com rapidez a morfologia bacteriana, pelo que o clínico deve ser informado de imediato em razão da urgência inerente a esta situação.

Figura 25 – Garrafas de hemocultura anaeróbia e aeróbia.

7.5.10. Líquidos de cavidades serosas

Os líquidos de cavidades serosas são fisiologicamente estéreis, pelo que qualquer MO aí detetado deve ser valorizado[69]. O laboratório atua segundo instruções de trabalho que preconizam o tratamento das amostras de líquido pleural, ascítico, peritoneal, sinovial e pericárdico.

A colheita é efetuada através de técnica asséptica. O procedimento laboratorial inicia-se com o exame macroscópico do aspeto do líquido. A presença de turvação indica uma potencial infeção pelo que as amostras são diretamente inoculadas nos meios de cultura de PVX (CO_2, 37°C, 24 a 48h), COS (CO_2, 37°C, 24 a 48h) e MCK (aerobiose, 37°C, 24h). Caso a amostra se apresente límpida utiliza-se o sedimento obtido por centrifugação para o exame cultural e para o exame microscópico. O exame microscópico compreende a realização de esfregaço em lâmina corada por coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen.

O exame cultural é ainda complementado pela inoculação do líquido seroso no caldo de BHI a 37°C por tempos determinados consoante o local anatómico. Seguidamente, o caldo é semeado nos mesmos meios e condições que as amostras iniciais.

7.6. Caso Clínico – *Streptococcus agalactiae*: sensibilidade na deteção

O caso clínico que se apresenta mais não é do que o relato de uma situação em que o espírito crítico dos técnicos superiores de análises foi crucial para a resolução de uma problemática apresentada por uma utente.

Na posse de uma requisição clínica, a jovem adulta não grávida dirigiu-se ao laboratório para colheita de zaragatoa vaginal e anal no contexto duplo de análise ao exsudado vaginal e

pesquisa orientada de *Streptococcus* do grupo B de Lancefield. Perante um resultado negativo no exsudado vaginal para qualquer MO e positivo na pesquisa de *Streptococcus*, a utente solicitou esclarecimentos.

Efetivamente, foi-lhe explicado que a pesquisa de *Streptococcus* do grupo B é realizada também em zaragatoa anal, sendo a inoculação realizada através das duas zaragatoas colocadas no mesmo meio, pelo que a bactéria poderia estar apenas no canal anal. Por outro lado, a pesquisa dos estreptococos é realizada com recurso ao caldo de enriquecimento de TODDH-T que possibilita detetar a bactéria, mesmo quando presente em quantidades diminutas. A pesquisa não orientada na gelose de COS, preconizada no exsudado vaginal, não permite o isolamento seletivo destas bactérias diante da vastíssima microbiota vaginal. Carecendo de sensibilidade, o resultado pode ser negativo.

8. CONCLUSÃO

A experiência de estágio foi bastante enriquecedora na medida em que proporcionou um contato direto com o ambiente profissional laboratorial, que antes desconhecia. A elevada demanda conferida pelo fluxo de trabalho diário foi um desafio interessante e no qual pude participar como parte integrante de uma equipa técnica qualificada e em que todos colaboravam para um só bem-comum: a produção de resultados de qualidade.

Ao longo do estágio beneficiei do apoio e da transmissão dos conhecimentos inerentes às atividades desempenhadas, onde tive oportunidade de contactar com novas técnicas e com um método de trabalho bastante automatizado. Contudo, é clara a importância dos técnicos superiores de saúde mesmo num ambiente automatizado pois são eles que, fazendo uso do pensamento crítico e experiência prática adquirida, são capazes de descortinar as várias problemáticas da rotina, garantindo o bem-estar dos doentes. Com efeito, o diagnóstico e tratamento rápidos e adequados, que advém do sucesso das análises clínicas, terão inevitavelmente impacto no prognóstico dos doentes.

Por todas estas razões considero que o objetivo educacional do estágio foi cumprido, nomeadamente a aplicação e consolidação dos conhecimentos adquiridos na minha formação superior, a integração no meio profissional e o contacto e cooperação multidisciplinar com outros profissionais de saúde.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Sciacovelli L, Zardo L, Secchiero S, et al. Quality specifications in EQA schemes: from theory to practice. *Clinica Chimica Acta* 2004; 346: 87–97.

2. Najat D. Prevalence of pre-analytical errors in clinical chemistry diagnostic labs in Sulaimani City of Iraqi Kurdistan. *PLoS One*; 12. Epub ahead of print 2017.

3. Lippi G, Mattiuzzi C, Favaloro E. Pre-analytical variability and quality of diagnostic testing. Looking at the moon and gazing beyond the finger. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science* 2015; 69: 04-08.

4. Lippi G, Guidi G, Mattiuzzi C, et al. Preanalytical variability: The dark side of the moon in laboratory testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2006; 44: 358–365.

5. Findlay J, Smith W, Lee J, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 21: 1249–1273.

6. Sysmex. XN-9100-Hematology-Analyzer, https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-9100-Hematology-Analyzer.aspx (2023, accessed 10 July 2023).

7. Singh P, Batra H, Naithani M. History of biochemistry. *Bull Indian Inst Hist Med Hyderabad* 2004; 34: 75–86.

8. Ayemoba O, Okeji N, Hussain N, et al. Reference intervals of common clinical biochemistry analytes in young Nigerian adults. *PLoS One* 2021; 16: 17-21.

9. Siemens. ADVIA Chemistry XPT System, https://www.siemens-healthineers.com/pt/clinical-chemistry/systems/advia-chemistry-xpt-system (2023, accessed 4 July 2023).

10. Bakker E, Pretsch E. Modern potentiometry. *Angewandte Chemie International Edition* 2007; 46: 5660–5668.

11. Lindner E, Pendley B. A tutorial on the application of ion-selective electrode potentiometry: An analytical method with unique qualities, unexplored opportunities and potential pitfalls; Tutorial. *Analytica Chimica Acta* 2013; 762: 1–13.

12. Merck - Sigma Aldrich. Photometry & Reflectometry, https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/applications/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry (2023, accessed 6 July 2023).

13. Omar A, MatJafri M. Turbidimeter design and analysis: A review on optical fiber sensors for the measurement of water turbidity. *Sensors* 2009; 9: 8311–8335.

14. A. Menarini Diagnostics. UNAMAX, https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/diagn%C3%B3sticoprofissional/urian%C3%A1lise/unamax/caracter%C3%ADsticas (2023, accessed 25 July 2023).

15. A. Menarini Diagnostics. SediMAX conTRUST PRO, https://www.menarinidiagnostics.com/en-us/Home/Professional-Diagnostics/Urine-Sediment-Analysis/sediMAX-conTRUST-PRO/Features (2023, accessed 27 July 2023).

16. Chiasera J, Xu X. Liver function. In: Wolters Kluwer (ed) *Clinical Chemistry - Techniques, Principles and Correlations*. 2010, pp. 571–540.

17. Johnson-Davis K, McMillin G. Enzymes. In: *Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations*. Wolters Kluwer, 2010, pp. 281–308.

18. Higgins T, Eckfeldt J, Barton J. Hemoglobin, Iron and bilirubin. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier, 2012, pp. 985–1030.

19. Delaney M, Price C, Lamb E. Kidney disease. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*. Elsevier, 2012, pp. 1523–1608.

20. Polancic J. Electrolytes. In: *Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations*. Wolters Kluwer, 2010, pp. 356–383.

21. Fody, E. Pancreatic Function and Gastrointestinal Function. In: *Clinical Chemistry - Principles, Techniques, and Correlations*. Wolters Kluwer, 2018.

22. Sacks D. Diabetes mellitus. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier, 2012, pp. 1415–1456.

23. Direção-Geral da Saúde. Norma para o diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. 002/2011, Portugal: SNS, 2011.

24. Bourbon M, Alves A, Rato Q. *E-cor: Prevalência de fatores de risco cardiovascular na população portuguesa.* 2019.

25. Sociedade Portuguesa de Hipertensão. Fatores de risco cardiovascular, https://www.sphta.org.pt/pt/base8_detail/24/90 (2023, accessed 23 July 2023).

26. Apple F, Goetze J, Jaffe A. Cardiac function. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier, 2012, pp. 1457–1522.

27. Sethi A, Warnick R, Remaley A. Lipids and lipoproteins. In: *Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations*. Wolters Kluwer, 2010, pp. 328–355.

28. Darshan D. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4737.

29. Rockwood A, Bakowska E. Trace elements. In: *Clinical Chemistry - Techniques, Principles, Correlations*. Wolters Kluwer, 2010, pp. 403–423.

30. Nikolaisen C, Rekvig O, Nossent H. Rheumatoid factor by laser nephelometry and Waaler–Rose assay: prognostic value in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 269–276.

31. Bernardes S, Souza-Nogueira A, Moreira E, et al. Nimesulide-induced fatal acute liver failure in an elderly woman with metastatic biliary adenocarcinoma. A case report. *Sao Paulo Medical Journal* 2014; 133: 371–376.

32. Sweetman S. Analgesics, anti-inflamatory drugs and antipyretics. In: *Martindale - The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press, 2009, pp. 1–133.

33. Traversa G. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ* 2003; 327: 18–22.

34. Boelsterli U. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity. *Drug Saf* 2002; 25: 633–648.

35. INFARMED. Resumo das características do medicamento - Aulin, 100mg, comprimido. Portugal: Dafundo: Angelini Pharma Portugal, Lda., 1985.

36. Mingatto F, Rodrigues T, Pigoso A, et al. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 303: 601–607.

37. Ali M, Elsayed A, Mendez A, et al. Contact and remote breathing rate monitoring techniques: A Review. *IEEE Sens J* 2021; 21: 14569–14586.

38. Rodrigo L, Francisco R, Pérez-Pariente J, et al. Nimesulide-induced severe hemolytic anemia and acute liver failure leading to liver transplantation. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1341–1343.

39. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. Bacterial cell structure, physiology, metabolism and genetics. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 2–22.

40. Ursell L, Metcalf J, Parfrey L, et al. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* 2012; 70: S38–S44.

41. National Institutes of Health. NIH human microbiome project defines normal bacterial makeup of the body. *2012*, https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-human-microbiome-project-defines-normal-bacterial-makeup-body (accessed 13 July 2023).

42. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. The laboratory role in infection control. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 47–58.

43. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. Microscopic examination of materials from infected sites. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 126–168.

44. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. Use of colony morphology for the presumptive identification of microorganisms. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 169–180.

45. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. Antimicrobial susceptibility testing. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 274–313.

46. Nandi A, Yan L, Jana C, et al. Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 19: 1–19.

47. Richter O, Ludwig B. Cytochrome c oxidase — structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 2003; 147: 47–74.

48. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* - pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4: 119–128.

49. Burckhardt I, Panitz J, Burckhardt F, et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae*: Development of a standardized protocol for optochin susceptibility testing using total lab automation. *Biomed Res Int* 2017; 17: 1–7.

50. Guo L, Ye L, Zhao Q, et al. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J Thorac Dis* 2014; 6: 534–8.

51. BioMérieux. VITEK® 2 Sistema automatizado para testes de ID/AST, https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2 (2022, accessed 27 July 2023).

52. Benagli C, Rossi V, Dolina M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One* 2011; 6: e16424.

53. Fenselau C, Demirev P. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2001; 20: 157–171.

54. BioMerieux. VITEK® MS, https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-ms-0 (2022, accessed 28 July 2023).

55. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. Immunodiagnosis of infectious diseases. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 198–225.

56. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. Urinary tract infections. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 884–834.

57. Cook R, Reid G, Pond D, et al. Clue cells in bacterial vaginosis: immunofluorescent identification of the adherent Gram-negative bacteria as *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Infectious Diseases* 1989; 160: 490–496.

58. Mohan C, Lehman D, Manuselis G. Genital infections and sexually transmitted infections. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 901–932.

59. Centers for Disease Control and Prevention. *Prevention of perinatal group B Streptococcal Disease*. 19 November 2010.

60. Keen E, Aldous W. Genital infections and sexually transmitted infections. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Elsevier, 2015, pp. 901–931.

61. Kallapur S, Kramer B, Jobe A. Ureaplasma and BPD. *Semin Perinatol* 2013; 37: 94–101.

62. Ahmed J, Rawre J, Dhawan N, et al. Mycoplasma hominis: An under recognized pathogen. *Indian J Med Microbiol* 2021; 39: 88–97.

63. Mohan C, Lehman D, Manuselis G. Upper and lower respiratory tract infections. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 765–803.

64. Man W, Steenhuijsen W, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15: 259–270.

65. Murdoch D, Morpeth S, Hammitt L, et al. Microscopic analysis and quality assessment of induced sputum from children with pneumonia in the PERCH Study. *Clinical Infectious Diseases* 2017; 64: S271–S279.

66. Mohan C, Lehman D, Manuselis G. Skin and soft tissue infections. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 804–834.

67. Mohan C, Lehman D, Manuselis G. Gastrointestinal infections and food poisoning. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 835–853.

68. Pozio E. How globalization and climate change could affect foodborne parasites. *Exp Parasitol* 2020; 208: 107807.

69. Mohan C, Lehman D, Manuselis G. Bacteremia and sepsis. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, 2010, pp. 868–883.