

Preciosa Maria Teixeira de Sousa

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Preciosa Maria Teixeira de Sousa

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos da Silva e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

[Giving advice to his children]

*“One, remember to look up at the stars and not down at your feet.
Two, never give up work. Work gives you meaning and purpose and life is empty without it.
Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and don’t throw it away.”*

Stephen Hawking

Índice

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
Agradecimentos.....	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XV
1. Introdução.....	I
2. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica.....	3
2.1. Processo Analítico.....	3
2.2. Atividades Desenvolvidas.....	4
3. Bioquímica Clínica.....	9
3.1. Princípios de Instrumentação.....	9
3.2. Parâmetros Bioquímicos.....	11
3.2.1. Metabolismo dos Hidratos de Carbono.....	11
3.2.2. Metabolismo dos Lípidos.....	13
3.2.3. Função Renal.....	15
3.2.4. Função Hepática.....	17
3.2.5. Função Excretora - Derivados do Catabolismo da Hemoglobina.....	20
3.2.6. Função Pancreática.....	21
3.2.7. Função Cardíaca e Muscular.....	22
3.2.8. Metabolismo do Ferro.....	25
3.2.9. Metabolismo ósseo.....	26
3.2.10. Equilíbrio Hidro-eletrolítico.....	28
3.2.11. pH e Gases do sangue.....	30
3.3. Técnicas Manuais.....	32
4. Microbiologia.....	35
4.1 Exame Macroscópico, Microscópico e Cultural de Produtos Biológicos.....	35
4.2 Exame Bacteriológico e Micológico de Produtos Biológicos.....	42
4.3 Exame Micológico.....	52
4.4 Exame Micobacteriológico.....	52
4.5 Identificação de Microrganismos e Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos.....	53
4.5.1 Provas de Identificação.....	53
4.5.2 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos.....	56

4.6	Testes de Biologia Molecular.....	57
5.	Hematologia.....	59
6.	Imunologia/Hormonologia.....	61
7.	Controlo de Qualidade.....	63
8.	Conclusão.....	65
9.	Bibliografia.....	67

Índice de Figuras

Figura 1 - Diferença entre a atividade da Amilase e da Lipase na Pancreatite (retirada de <i>TIETZ Fundamentals of Clinical Chemistry</i>).....	22
Figura 2 - Representação da cinética dos diferentes marcadores cardíacos após um enfarte agudo do miocárdio (retirada de <i>HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods</i> , 22 ^a Ed., 2011, p. 252).....	24
Figura 3- Esquema da técnica de sementeira de urina segundo dois planos perpendiculares..	43
Figura 4 - Microrganismos isolados de amostras de urina A - <i>Escherichia coli</i> em CLED; B - <i>Klebsiella pneumoniae</i> em CLED (Fotos SPC-IPOCFG).....	44
Figura 5 - Tipos de Hemólise α - Microrganismo α -hemolítico; β - Microrganismo β -hemolítico; γ - Microrganismo γ -hemolítico (Fotos SPC-IPOCFG).....	54

Índice de Tabelas

Tabela I - Equipamentos utilizados no SPC (Fotos SPC-IPOCFG).....	5
Tabela II - Diagnóstico de Diabetes gestacional após PTGO.....	13
Tabela III - Diferentes causas e exame laboratorial de Azotemia.....	16
Tabela IV - Alterações do equilíbrio ácido-base.....	31
Tabela V - Técnica de coloração de Gram.....	36
Tabela VI - Técnica de coloração de Kinyoun.....	37
Tabela VII - Tabela de Murray e Washington.....	46
Tabela VIII - Cartas de Identificação, turvação utilizada para preparação de suspensão e Cartas de TSA.....	57
Tabela IX - Testes de Biologia Molecular do GeneXpert®	58
Tabela X - Controlo de qualidade interno e nº de níveis de controlo.....	63

Abreviaturas

ADH - Hormona Antidiurética

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ALP - Fosfatase Alcalina

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

B - Cérebro

BAAR - Bacilos Ácido-álcool Resistentes

BUN - Azoto Ureico

CAM - Gelose *Campylobacter*

CK- Creatina Cinase

CK-MB - Fração MB da Creatina Cinase

Cl⁻ - Cloro

CLED - Cistina, Lactose, Défice em Eletrólitos

CNA - Gelose de sangue, Colistina e Ácido Nalidíxico

CO₂ - Dióxido de Carbono

COS - Gelose Columbia suplementada com 5% sangue de carneiro

DNP - Desoxirribonucleoproteína

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Fator X - Heme

Fator V - NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

Fe - Ferro

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

HbA1c - Hemoglobina Glicada

HCO₃⁻ - Bicarbonato

HDL - *High-Density Lipoprotein*

HEK - Gelose Hektoen

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IPOCFG - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

K⁺ - Potássio

KCS - Caldo Schaedler com vitamina K3

KPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LDH - Lactato Desidrogenase

LDL - *Low-Density Lipoproteins*
LJ - Löwenstein-Jensen
M - Músculo
Mg²⁺ - Magnésio
MH - Gelose Muller-Hinton
MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
Na⁺ - Sódio
O₂ - Oxigénio
pCO₂ - Tensão de Dióxido de Carbono
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PCR - Proteína C-reativa
pO₂ - Tensão de Oxigénio
PTGO - Prova de tolerância à glicose oral
PTH - Hormona Paratiróide
PVX - Gelose chocolate + PolyViteX
RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*
SCS - Gelose Schaedler
SGC2 - Gelose Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol
SPC - Serviço de Patologia Clínica
TIBC - Capacidade Total de Fixação do Ferro
TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
UFC - Unidades Formadoras de Colónias
UIBC - Capacidade Latente de Ligação de Ferro
VLDL - *Very Low Density Lipoproteins*
XLD - Desoxicolato-Lisina-Xilose
γGT - Gama Glutamil Transferase

Agradecimentos

Ao Doutor Frederico Valido, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, meu orientador externo, expresso aqui o meu reconhecimento por me ter possibilitado realizar este trabalho, pela revisão do mesmo e pelos ensinamentos.

À Professora Doutora Leonor Almeida, pelo apoio e dedicação a este Mestrado e aos alunos que o frequentam.

À Professora Doutora Maria Céu Rodrigues Sousa, coordenadora do Mestrado de Análises Clínicas, pelo apoio prestado ao longo do percurso académico.

À Professora Doutora Ana Matos, minha orientadora interna, pela amabilidade e pela preciosa ajuda na correção e sugestões a este relatório de estágio.

À minha guerreira, a minha mãe, pela força e apoio incondicional que sempre me dá. Agradeço os valores e os ideais que me transmitiu e que fizeram de mim a pessoa que sou. A conclusão deste mestrado também se deve a ela.

Ao meu namorado António, pilar ao longo deste mestrado e estágio, sempre com uma palavra de apoio e com a paciência necessária, até nos dias que se tornaram exaustivos. Obrigada também pela ajuda dada neste relatório.

À mãe do meu namorado por todo o apoio que sempre me deu.

Aos meus amigos, Ana, Daniela, Daniel, Emanuel, Luís e Melanie, pela força e motivação que permitiram tornar esta caminhada mais fácil.

Aos meus colegas do Serviço de Patologia Clínica que de alguma forma contribuíram para a realização deste relatório, especialmente à Ângela, Joana e Rita, minhas colegas e amigas.

À Marilisa pela amizade e partilha de conhecimentos e ao Luís Miguel pela sua disponibilidade e auxílio prestado com os conhecimentos de informática.

Resumo

Ocorreram muitos avanços no diagnóstico e tratamento da doença, sendo o Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil um exemplo a seguir pela excelência dos cuidados de saúde que presta. Neste hospital está englobado o Serviço de Patologia Clínica, serviço clínico-laboratorial, no qual as análises clínicas são fundamentais na rotina hospitalar e no apoio ao diagnóstico, prognóstico, tratamentos e monitorização do doente oncológico.

O principal objetivo deste relatório foi descrever as atividades realizadas durante o estágio no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil englobando a rotina laboratorial, os parâmetros realizados, a sua metodologia e o controlo de qualidade. O Laboratório é dotado do equipamento mais recente nas áreas da Bioquímica Clínica, Hematologia, Imunologia/Hormonologia e Microbiologia. Estas áreas são extremamente importantes na prática laboratorial das Análises Clínicas e assumem um papel de grande destaque para o clínico.

Neste trabalho dei especial destaque às áreas da Bioquímica Clínica e da Microbiologia, transmitindo, sobretudo, a aplicabilidade destas áreas na clínica.

Palavras – chave: Bioquímica Clínica, Microbiologia, Análises Clínicas, Parâmetros Bioquímicos, Microrganismos.

Abstract

There have been many advances in the diagnosis and treatment of the disease, with the Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil being an example to follow for the excellence of the health care it provides. In this hospital is included the Service of Clinical Pathology, clinical-laboratory service, in which clinical analyses are fundamental in the hospital routine and in the support to the diagnosis, prognosis, treatments and monitoring of the patient with cancer.

The main objective in this report was to describe the activities carried out during the internship at the Clinical Pathology Service of the Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, including the laboratory routine, the parameters performed, its methodology and the quality control. The Laboratory is equipped with the latest equipment in the areas of Clinical Biochemistry, Hematology, Immunology/Hormonology and Microbiology. These areas are extremely important in the laboratory practice of Clinical Analysis and play a major role for the clinician.

In this work I gave special attention to the areas of Clinical Biochemistry and Microbiology, transmitting, above all, the applicability of these areas in the clinic.

Key words: Clinical Biochemistry, Microbiology, Clinical Analysis, Biochemical Parameters, Microorganisms.

I. Introdução

“O cancro é uma das doenças do presente (e do futuro) que para além da necessidade dum perspectiva clínica multidisciplinar, reclama uma abordagem social concertada, que se estende para além dos muros das estruturas da saúde”.

PORTUGAL Doenças Oncológicas em Números
Direção-Geral da Saúde

Ao iniciar este relatório de estágio não quero deixar de referir que trabalhar em Oncologia é uma prova a que estamos sujeitos diariamente. É preciso um estado de espírito que o tempo vai moldando, pois a doença oncológica em si e tudo o que a envolve é sem dúvida marcante. Tratando-se dum doença crónica, o contacto com o doente é uma constante ao longo do tempo permitindo acompanhar as diversas fases por que passa, quer nas consequências físicas quer no estado de espírito. É este contacto e a perceção destas situações que nos faz crescer como pessoas e profissionais.

Numa instituição como o Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) o doente não é um número, mas sim uma pessoa com uma identidade e comportamentos próprios que têm de ser considerados e respeitados. Conseguir apaziguar um pouco a dor dos doentes, nem que seja na forma de umas pequenas palavras, é dar-lhes alguma esperança. E o IPOCFG também é esperança.

NO IPOCFG os avanços no rastreio, diagnóstico, principalmente o precoce, e os tratamentos têm permitido uma evolução muito favorável nos resultados obtidos em relação à cura, ao intervalo livre de doença e à qualidade de vida dos doentes.

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) é um serviço clínico-laboratorial inserido na estrutura do IPOCFG cuja função “major” é a determinação de parâmetros analíticos que permitam auxiliar os clínicos no diagnóstico, prognóstico, tratamentos e avaliação da doença. Neste serviço vários profissionais de diferentes formações de base, trabalham em conjunto em prol de uma causa com que todos se reveem.

Tive oportunidade de realizar o estágio do mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) no SPC, local onde trabalho há 4 anos e onde exerço as funções de Técnica Superior de Análises Clínicas e Saúde Pública.

No SPC são atendidos, em média, 370 doentes/dia que se traduzem em milhares de análises, de maior ou menor complexidade, sujeitas a um controlo de qualidade rígido e apertado de modo a que o seguimento dos doentes (*Follow up*) seja o mais preciso. Este está

dividido em 5 setores, Bioquímica Clínica, Hematologia, Imunologia/Hormonologia e Microbiologia.

Neste relatório de estágio irei prestar especial atenção aos setores da Bioquímica Clínica e da Microbiologia. Dois setores com características muito próprias ressaltando logo o elevado e sofisticado sistema automático na área da Bioquímica Clínica e ainda o caráter individual que a Microbiologia possui que, sendo o setor menos automatizado, permite uma observação e aquisição de conhecimentos muito relevantes nas análises clínicas.

2. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica

Os primeiros passos para a criação do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil surgem em 1953 com a aquisição de uma pequena vivenda, onde o Prof. Doutor Luís Raposo defendeu a criação de um centro anticanceroso capaz de dar resposta à população do centro do país. “Da pequena vivenda até aos nossos dias decorreram cerca de 65 anos. Demolindo velhas estruturas e remodelando outras, modernizando equipamentos e espaços, a instituição não tem parado de crescer, fiel ao seu mais nobre compromisso: a excelência do bem cuidar o doente oncológico.” (Um caminho com história – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil)

Inserido no IPOCFG temos o Serviço de Patologia Clínica dirigido pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, especialista em Patologia Clínica pela ordem dos médicos. O SPC conta ainda com uma equipa de cerca de 34 elementos com formações diversas, desde Médicos, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, Farmacêuticos, Bioquímicos, Biólogos, Administrativos e Auxiliares.

No SPC o atendimento do doente é feito na área administrativa, sendo realizado o registo das análises pedidas nas requisições médicas, ficando este registo associado ao processo clínico. O sistema informático atribui ao doente um número interno que inclui o ano, o mês, o dia e um número de ordem sequencial às etiquetas que são colocadas nas requisições. Após este registo administrativo os Técnicos de Análises Clínicas imprimem as etiquetas técnicas para os tubos correspondentes para posterior colheita.

Na sala de espera que o SPC dispõe, é onde o doente aguarda ser chamado para uma das duas salas de colheitas e receção de amostras. De salientar que as colheitas de análises tanto em ambulatório como nas enfermarias são feitas pelos Técnicos de Análises Clínicas.

2.1. Processo Analítico

- Fase pré-analítica

Previamente à colheita de sangue deve ser feita a correta identificação dos tubos, para que não haja possibilidade de troca ou má utilização da amostra. É também necessário confirmar todos os pedidos do clínico, pois existem parâmetros, como é exemplo as metanefrinas, em que a sua colheita deve ser feita após 30 minutos em decúbito. Nesta fase é necessário ter atenção à quantidade de amostra necessária, pois nos tubos com anticoagulante deve-se respeitar as proporções corretas. Nas colheitas efetuadas nas

enfermarias é necessário ter especial atenção a que o sangue não seja colhido em locais de acesso venoso com infusão de líquidos, evitando assim a hemodiluição.

O próprio ato da colheita é importante, pois deve ser evitada a ocorrência de hemólise ou formação de coágulos e as condições de transporte/armazenamento devem ser respeitadas. Todos os procedimentos que compõem a fase pré-analítica são importantes, pois é nesta fase que ocorrem a maior parte dos erros em laboratório.

- Fase analítica

No processamento da amostra, o SPC executa as mais diversas análises pedidas pelo clínico englobadas nos setores a que pertencem, sendo estes a Bioquímica Clínica, a Hematologia, a Imunologia/Hormonologia e a Microbiologia. Posteriormente, quando a amostra chega ao respetivo setor, é dada a entrada no sistema informático e a amostra é processada.

- Fase pós-analítica

Nesta fase é feita a validação dos resultados obtidos de forma a perceber se estes se encontram de acordo com o estado clínico do doente, sendo emitidos relatórios com os resultados das análises assinados pelo especialista.

2.2. Atividades Desenvolvidas

O SPC está dividido em setores por uma questão de organização funcional procurando ao máximo a rentabilização dos equipamentos e a especialização do pessoal. As amostras mais comuns são sangue total, soro/plasma e urina. O setor da Microbiologia apresenta um leque mais variado de amostras. O SPC está dotado nos diferentes setores de equipamentos recentes que auxiliam os técnicos na execução das amostras:

Tabela I - Equipamentos utilizados no SPC (Fotos SPC-IPOCFG)









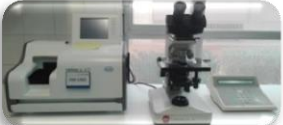

Equipamentos utilizados no SPC	Identificação	Análises Realizadas
Bioquímica		
	Cobas® 6000 Analyser Series Roche® Diagnostics	<ul style="list-style-type: none"> - Hidratos de Carbono - Lípidos e Proteínas - Compostos azotados - Eletrólitos e iões <ul style="list-style-type: none"> - Enzimas - Bilirrubina - Hemoglobina Glicada
	Cobas® c31 I Roche® Diagnostics	<ul style="list-style-type: none"> - Hidratos de Carbono - Lípidos e Proteínas - Compostos azotados - Eletrólitos e iões <ul style="list-style-type: none"> - Enzimas - Bilirrubina
	AQT90 FLEX Radiometer®	- Marcadores Cardíacos
	Rapidlab® 1265 Siemens	<ul style="list-style-type: none"> - Gasometria - Ionograma - pH e gases do sangue
	ABL 800 FLEX Radiometer®	<ul style="list-style-type: none"> - Cálcio ionizado - pH e gases do sangue
	RapidChem™ 744 Bayer®	- Ionograma
	Reflotron® Plus Roche® Diagnostics	<ul style="list-style-type: none"> - Ácido Úrico, Amilase, ALT, AST, CK, Bilirrubina Total, Colesterol, Creatinina, Fosfatase Alcalina, γGT, Glicose, Ureia, Triglicerídeos
	UV 1800 Shimadzu Spectrophotometer	- Ensaios espectrofotométricos (Cobre e outras técnicas manuais)
Microbiologia		
	Cobas u41 I Roche® Diagnostics Miditron® ST Mannheim Boehringer	- Sumária urina tipo II com observação de sedimento
	VITEK® 2 Compact 15 bioMérieux™ VITEK® Systems ATB Expression bioMérieux™	<ul style="list-style-type: none"> - Identificação de microrganismos baseada no sistema API® - Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Tabela I - Equipamentos utilizados no SPC (Fotos SPC-IPOCFG) (Continuação)










Equipamentos utilizados no SPC	Identificação	Análises Realizadas
	BD Bactec™9050 Blood Culture System Becton Dickinson	- Hemoculturas
	GeneXpert® Cepheid	PCR em tempo real: - <i>Clostridium difficile</i> - Micobactérias - MRSA - KPCs
Hematologia		
	Beckman Coulter® LH 750 Analyzer	- Hemogramas - Contagem diferencial de leucócitos - Contagem celular em líquidos orgânicos
	Bcl da Alifax® SPA	- Velocidade de Sedimentação Globular
	Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Cytocentrifuge WESCOR®	- Coloração de esfregaços de sangue periférico e aspirados de medula óssea
	ACL TOP® 500 CTS Instrumentation Laboratory	- Estudos de hemóstase
	Beckman Coulter® Cytomics™ FC 500 Beckman Coulter® TQ Prep™	- Estudo de imunofenotipagem por citometria de fluxo
	GeneXpert® Cepheid	PCR em tempo real: - BCR-ABL - Fator V Leiden
Imunologia/Hormonologia		
	Immolute2000® XPi + VersaCell™ Siemens	- Marcadores Tumorais - Anticorpos anti-tiroideos - Hormonas - Proteínas
	ADVIA Centaur XP Siemens	- Marcadores Tumorais - Hormonas - Anticorpos - Vitaminas - Proteínas

Tabela I - Equipamentos utilizados no SPC (Fotos SPC-IPOCFG) (Continuação)

Equipamentos utilizados no SPC	Identificação	Análises Realizadas
	Cobas e411 Analyser® Roche®	<ul style="list-style-type: none"> - Marcadores Tumorais - Marcadores de Infecção - Hormonas - Vitaminas
	BN ProSpec® Siemens	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas Inflamatórias - Imunoglobulinas
	Kryptor® Brahms™	<ul style="list-style-type: none"> - Marcadores Tumorais - Marcadores Inflamatórios - Hormonas
	Viva-E® Siemens	<ul style="list-style-type: none"> - Doseamento de fármacos
	Liaison® DiaSorin™	<ul style="list-style-type: none"> - Marcadores Tumorais - Marcadores de Infecção
	Wallac Wizard 1470 Gamma Counter Thermo Fisher Scientific	<ul style="list-style-type: none"> - Hormonas e metanefrinas por técnicas manuais com recurso a radioisótopos
	Hydrasys® Sebia®	<ul style="list-style-type: none"> - Ensaio eletroforéticos e de imunofixação em gel de agarose
	ImmunoCAP® Thermo Scientific™	<ul style="list-style-type: none"> - Autoimunidade

3. Bioquímica Clínica

Este setor está sob a responsabilidade do Dr. Luís do Espírito Santo Nina, Assistente Hospitalar Graduado Especialista em Análises Clínicas.

A análise de amostras como sangue total, soro, urina, entre outros líquidos biológicos, permite determinar os analitos necessários ao estudo do doente. Além desta componente clínica não esquecer também os restantes meios auxiliares de diagnóstico, que no seu conjunto permitem o conhecimento do estado do doente.

A Bioquímica é uma área que auxilia o clínico no diagnóstico, mas também na monitorização da terapêutica, sendo que em oncologia, os resultados das análises dos doentes são fundamentais para a administração dos tratamentos de quimioterapia.

Durante a terapêutica, especialmente na administração de drogas (quimioterapia) o seguimento do doente permite aferir a eficácia do tratamento. Nestes doentes o controlo é muito importante uma vez que os tratamentos utilizados afetam bastante o normal funcionamento de órgãos e sistemas.

O setor da Bioquímica clínica está dotado de equipamentos recentes, que são alvo de criteriosa escolha, dado tratar-se de um hospital oncológico em que o “*follow up*” dos doentes é de extrema importância.

3.1. Princípios de Instrumentação

A. Espectrofotometria

A espectrofotometria é a medida de absorção ou transmissão de radiação eletromagnética, por diversas moléculas, quando os seus eletrões se movimentam entre níveis energéticos. Após reações químicas que facilitam o doseamento do analito é possível medir a sua absorção ou emissão, por espectrofotometria, e estabelecer uma relação com a concentração desses analitos nos fluídos biológicos, através dos espectros característicos entre o ultravioleta, visível e o infravermelho.

Um espectrofotómetro é um instrumento ótico usado para a identificação visual de linhas de emissão atómica. A absorvância da amostra é medida, e a sua concentração é determinada usando cálculos baseados na Lei de *Beer-Lambert*. Nesta equação é estabelecido um quociente entre a luz incidente e a luz transmitida e o logaritmo deste quociente traduz a absorvância, sendo que a absorvância pode ser diretamente ou inversamente proporcional à concentração da substância a analisar.

A determinação da concentração da substância a analisar envolve a utilização de uma solução de referência, solução padrão, com diferentes concentrações que têm já a sua absorvância determinada e conhecida, a qual permite o cálculo do coeficiente de extinção molar que será utilizado no cálculo da concentração de analito na amostra.

A espectrofotometria é muito importante em bioquímica clínica estando associada a reações colorimétricas, enzimáticas e turbidimétricas (1).

Equipamentos do SPC: Cobas® 6000 Analyser Series, Cobas® c311, ambos da Roche® Diagnostics.

B. Potenciometria

A potenciometria é a técnica utilizada para a medição da voltagem gerada pela atividade dos iões. A potenciometria consiste na medição do potencial gerado entre dois elétrodos numa célula eletroquímica, sendo esta composta por 2 elétrodos (1 eléctrodo de medição e 1 eléctrodo de referência), uma solução de eletrólito (solução da amostra) e um dispositivo de medição como um voltímetro.

O eléctrodo de medição destina-se a responder a alterações na concentração do ião que está a ser medido na solução de amostra, em que o eléctrodo de medição desenvolve um potencial de semicélula que está diretamente relacionado com a concentração ou a atividade do ião específico. O potencial que o sensor mede é na realidade a atividade do ião na solução. O eléctrodo de referência fornece um potencial fixo e inalterado à célula que servirá como comparação com o potencial gerado pelo eléctrodo de medição. Através da equação de *Nernst* é determinada a concentração do ião da amostra em causa (2).

Equipamentos do SPC: Cobas® 6000 Analyser Series Roche® Diagnostics, Cobas® c311 Roche® Diagnostics, Rapidlab® I265 Siemens, ABL 800 FLEX Radiometer®, RapidChem™ 744 Bayer®.

C. Amperometria

A amperometria é utilizada para determinar a quantidade de uma substância específica na solução, aplicando uma tensão fixa entre dois elétrodos numa célula eletroquímica, medindo em seguida a corrente gerada como resultado de uma reação que produz ou que consome eletrões, respetivamente oxidação ou redução.

A corrente medida é diretamente proporcional à concentração de substância (oxidável ou redutível) presente na solução de amostra (2).

Equipamento do SPC: Rapidlab® I265 Siemens.

D. Refratometria – Química Seca

A refratometria é baseada na refração da luz. Quando esta passa de um meio para o outro, o feixe de luz muda a sua direção no limite da superfície se a velocidade de propagação da luz no segundo meio for diferente da velocidade de propagação da luz no primeiro meio. A refratividade de um líquido depende do comprimento de onda incidente, da temperatura e da natureza do meio líquido, sendo que a refratividade de uma solução permite o doseamento indireto da concentração do soluto.

No aparelho utilizado no SPC todos os reagentes necessários para a determinação das principais análises bioquímicas estão contidos de forma seca e estável numa tira de reação onde vai ser colocado sangue total ou soro, que provoca uma alteração de cor na tira, sendo esta alteração convertida posteriormente na concentração do analito em causa. Este equipamento não é utilizado em rotina dado ser monocanal, mas é muito importante para confirmação de valores que possam suscitar dúvidas ao clínico, pois a obtenção de um resultado ronda em média 150 segundos (1).

Equipamento do SPC: Reflotron® Plus Roche® Diagnostics.

3.2. Parâmetros Bioquímicos

3.2.1. Metabolismo dos Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono realizam múltiplas funções. São constituintes dos componentes estruturais do ácido ribonucleico e do ácido desoxirribonucleico e são uma fonte de energia para as células através da glicose (3).

A patologia mais comum consequente dos distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono é a diabetes *mellitus*, que é um conjunto de doenças onde os níveis de glicose no sangue se encontram aumentados. Esta doença crónica é a principal causa de doença renal em fase terminal, a causa mais comum de amputações não-traumáticas e a principal causa de cegueira em adultos (3).

O estudo das alterações no metabolismo dos hidratos de carbono é imprescindível na clínica. Deste modo, o doseamento da glicose e da hemoglobina glicada é de suma importância para o diagnóstico, para os testes de rotina e para a monitorização de diabéticos, permitindo o controlo dos níveis glicémicos.

A. Glicose

A glicose é o principal hidrato de carbono presente no sangue periférico e a sua oxidação constitui a principal fonte de energia celular do organismo. A glicose proveniente

da dieta é convertida em glicogénio sendo armazenado no fígado, ou em ácidos gordos armazenados no tecido adiposo. A concentração da glicose no sangue é mantida dentro de limites estreitos por ação de muitas hormonas, sendo a mais importante produzida pelo pâncreas, a insulina. O doseamento da glicose é imprescindível para o diagnóstico e monitorização de doenças provocadas pela alteração desta hormona.

A diabetes *mellitus* é a causa mais frequente de hiperglicemia, originada por um défice da secreção ou da ação da insulina. Vários fatores secundários contribuem também para a existência de níveis elevados de glicose no sangue. Entre estes incluem-se a pancreatite, a disfunção da tiroide, a insuficiência renal e hepatopatias.

A hipoglicemia observa-se com menos frequência, no entanto, são várias as doenças que podem originar uma diminuição dos níveis de glicose no sangue. Entre estas encontra-se o insulínoma, o hipopituitarismo e a hipoglicemia induzida por insulina.

A determinação da glicose também pode ser feita na urina e no líquido cefalorraquidiano. A sua determinação na urina serve para despiste da diabetes e como auxiliar na avaliação da glicosúria, para detetar defeitos tubulares renais e no controlo da diabetes *mellitus*. A determinação de glicose no líquido cefalorraquidiano é utilizada na avaliação da meningite, no envolvimento neoplásico das meninges e de outras perturbações neurológicas (3).

B. Prova de tolerância à glicose oral

No SPC a prova de tolerância à glicose oral (PTGO) pode ser feita para diagnóstico de hiperglicemia intermédia ou para diagnóstico de diabetes gestacional.

A prova consiste no doseamento da glicose em jejum, e após a ingestão de 75 gr de glicose. No diagnóstico de diabetes gestacional o doseamento de glicose é feito 1 hora e 2 horas após a ingestão da solução. No diagnóstico de hiperglicemia intermédia o doseamento de glicose é feito 2 horas após a ingestão da solução.

O diagnóstico de hiperglicemia intermédia faz-se com base nos seguintes parâmetros:

- ✿ Anomalia da Glicemia de Jejum: glicemia em jejum ≥ 110 e < 126 mg/dl;
- ✿ Tolerância Diminuída à Glicose: glicemia às 2h após PTGO ≥ 140 e < 200 mg/dl.

Por outro lado, o diagnóstico da diabetes gestacional faz-se com base nos seguintes valores:

- ✿ Glicemia de jejum, na 1.^a consulta de gravidez ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl;
- ✿ Se a Glicemia em jejum for < 92 mg/dl, realiza-se PTGO, às 24-28 semanas de gravidez.

É critério para diagnóstico de diabetes gestacional, após PTGO, a confirmação de um ou mais valores dos indicados na tabela II: (4)

Tabela II - Diagnóstico de Diabetes gestacional após PTGO.

Tempo (horas)	Glicémia	
0	≥ 92 mg/dl	
1	≥180 mg/dl	Diabetes
2	≥153 mg/dl	Gestacional

C. Hemoglobina Glicada

A hemoglobina glicada (HbA1c) resulta de uma reação não enzimática, lenta e irreversível (glicação), entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos. A HbA1c define-se como a hemoglobina irreversivelmente glicada na porção N-terminal da valina, em uma ou nas duas cadeias beta da hemoglobina.

A HbA1c deve ser determinada, por rotina, em todas as pessoas com diabetes *mellitus*, para controlo glicémico. Para o diagnóstico da diabetes deverá privilegiar-se o valor tradicional da glicose em jejum no plasma ou os valores da PTGO (5).

A hemoglobina glicada é um indicador de grande utilidade na clínica, pois reflete a glicemia média nas últimas 8 a 12 semanas, atendendo a que o tempo médio de vida dos eritrócitos é de 120 dias, tornando-se assim um parâmetro eficaz no controlo da glicose no sangue a longo prazo (6).

3.2.2. Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos podem desempenhar diferentes papéis: funcionam como hormonas, podem ser captados como fonte de energia, auxiliam na digestão e atuam como componentes estruturais nas células.

Além disso, os lípidos e as lipoproteínas estão intimamente envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, um processo patogénico que é a causa subjacente de doenças cardiovasculares, como o enfarte do miocárdio ou doenças cerebrovasculares.

A análise laboratorial de cada uma das principais classes de lípidos e lipoproteínas tem um significado clínico muito importante podendo determinar estes fatores de risco (7).

A. Colesterol total

O colesterol e os triglicerídeos são os lípidos plasmáticos de maior interesse para o diagnóstico e para o tratamento dos transtornos das lipoproteínas.

O colesterol é sintetizado em muitos tipos de tecidos, mas sobretudo no fígado e na parede intestinal. Sendo que cerca de três quartos do colesterol são formados por síntese e apenas um quarto tem origem na dieta alimentar. As determinações do colesterol são utilizadas para despiste do risco aterogénico e para diagnóstico e tratamento de doenças que envolvam perturbações do metabolismo lipídico (8).

B. Triglicerídeos

Os triglicerídeos são ésteres do glicerol-álcool tri-hidratado com 3 ácidos gordos de cadeia longa. São parcialmente sintetizados no fígado e parcialmente ingeridos com os alimentos.

A determinação dos triglicerídeos é utilizada no diagnóstico e tratamento de doentes com diabetes *mellitus*, nefrose, obstrução hepática, alterações do metabolismo dos lípidos e inúmeras outras doenças endócrinas (8).

C. Colesterol LDL (*Low-Density Lipoproteins*)

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) derivam das lipoproteínas de muito baixa densidade - *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) ricas em triglicerídeos, através da ação de várias enzimas lipolíticas, sintetizadas no fígado. A eliminação das LDL do plasma ocorre sobretudo através das células do parênquima hepático pelos recetores específicos das LDL.

Concentrações elevadas no sangue e o aumento do seu tempo de permanência, associados a um aumento da taxa de modificação biológica, resultam na destruição da função endotelial e numa captação superior do colesterol LDL pelas células do músculo liso nas paredes dos vasos sanguíneos. Deste modo, este tipo de colesterol é apelidado de “mau colesterol” pois desempenha um papel fulcral na formação e desenvolvimento da aterosclerose e, especialmente, da esclerose coronária.

No SPC é feito o doseamento do colesterol LDL, por um ensaio colorimétrico enzimático e também é feito o cálculo deste através da fórmula de *Friedewald*:

$$[\text{Colesterol LDL}] = (\text{Colesterol total} - \text{Colesterol HDL}) - \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$$

No entanto, o valor comunicado ao clínico é o colesterol LDL doseado, pois é o valor mais exato. Este colesterol LDL é o que tem um valor preditivo clínico mais

importante em relação à aterosclerose coronária. Por conseguinte, as terapêuticas que visam a redução lipídica têm como principal alvo a redução do colesterol LDL, que resulta numa melhoria da função endotelial e na prevenção da aterosclerose, reduzindo assim a sua progressão (8).

D. Colesterol HDL (*High-Density Lipoprotein*)

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são responsáveis pelo transporte inverso do colesterol das células periféricas para o fígado. Aqui, o colesterol é transformado em ácidos biliares que são excretados para os intestinos através das vias biliares.

É clinicamente importante monitorizar o colesterol HDL no soro, pois existe uma correlação inversa entre as concentrações séricas deste colesterol e o risco de doença aterosclerótica. Concentrações elevadas de colesterol HDL são protetoras contra as doenças coronárias, enquanto concentrações reduzidas deste colesterol, especialmente em conjunto com triglicerídeos elevados, aumentam o risco cardiovascular, sendo este apelidado de “bom colesterol”, devido ao seu efeito cardioprotetor (9,10).

3.2.3. Função Renal

Ureia, creatinina, e ácido úrico são compostos nitrogenados removidos do corpo pelo rim após filtração glomerular. Medições das concentrações séricas destes metabolitos são comumente usadas como indicadores da função renal (11).

A interpretação adequada destes parâmetros bioquímicos é muito importante pois a doença renal é uma das principais sequelas de distúrbios comuns, como a diabetes e a hipertensão.

A. Ureia

A ureia é um composto sintetizado pelo fígado a partir do amoníaco e metabolito final do catabolismo proteico exógeno e endógeno. A ureia é degradada nos intestinos por ação bacteriana, pode ser excretada pelo suor, em quantidades mínimas, no entanto, mais de 90% da ureia é excretada na urina. A determinação do azoto ureico no sangue quando utilizado em conjunto com as determinações séricas de creatinina, pode auxiliar no diagnóstico diferencial dos três tipos de azotemia: pré-renal, renal e pós-renal, descritas na tabela III (11).

Tabela III - Diferentes causas e exame laboratorial de Azotemia.

Azotemia pré-renal	Azotemia Renal	Azotemia pós-renal
Causas		
Perfusão renal inadequada	Nefrite crónica	Obstrução aparelho urinário
Choque	Nefrosclerose	
Diminuição do volume sanguíneo	Necrose tubular	
	Nefrite glomerular	
Exame Laboratorial		
Excesso de proteínas	Proteinúria	Grande aumento da ureia em relação à creatinina
Aumento do catabolismo proteico	Diminuição da taxa de filtração glomerular	
Aumento de creatinina e ureia séricas	Perda da capacidade de concentrar urina	

- Azoto ureico / BUN:

O Azoto ureico é determinado pela concentração da ureia aplicada à equação:

$$\text{BUN} = \frac{[\text{Ureia}]}{2,14 \text{ mg/dL}}$$

B. Creatinina

A quantidade de creatinina produzida está relacionado com a massa muscular. Em condições normais é produzida e libertada a uma taxa constante, sendo os valores plasmáticos mantidos dentro de valores muito estreitos. Assim a depuração renal da creatinina é um bom indicador da taxa de filtração glomerular (11).

A sua determinação no SPC é muito importante no diagnóstico e monitorização de diversas doenças renais crónicas e agudas (glomerulonefrites, pielonefrites, infeção urinária, cálculo renal, entre outras) estando intimamente ligada a patologias como obesidade, hipertensão, diabetes, utilização de fármacos entre outras.

- Clearance da Creatinina

Os níveis séricos de creatinina não são marcadores sensíveis da função renal em doença renal crónica, pois existem características próprias do indivíduo, como a massa muscular, que podem interferir no resultado final da creatinina. Assim sendo a clearance da creatinina tem sido mais sensível para deteção de disfunções renais do que a medida da creatinina plasmática. No entanto, esta determinação requer uma colheita de urina temporizada, de quatro, doze ou vinte e quatro horas (11).

O cálculo da clearance da creatinina é determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{Clearance creatinina} = \frac{\text{Creatinúria} \times \text{Débito urinário (mL/min)}}{\text{Creatinémia}}$$

C. Ácido Úrico

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas no organismo humano. As determinações de ácido úrico no soro são usadas no diagnóstico e tratamento de diversas perturbações renais e metabólicas, incluindo insuficiência renal, gota, subnutrição e de doentes a receber terapêuticas citostáticas (*follow up*) (11).

D. Amónia

A amónia é gerada principalmente no trato gastrintestinal através do metabolismo dos compostos com azoto. O excesso de amónia pode ser tóxico para o sistema nervoso central, sendo que o ciclo da ureia constitui uma forma de eliminar a amónia através da sua metabolização em ureia, no fígado.

Os níveis elevados de amónia podem ser um auxílio no diagnóstico de insuficiência hepática ou de encefalopatia hepática com origem em doenças hepáticas avançadas, como é o caso da hepatite viral ou da cirrose.

E. Microalbuminúria

A microalbuminúria é a presença de albumina na urina acima do nível normal. A albumina é uma proteína de baixo peso molecular, e quando há lesão renal é uma das primeiras proteínas detetadas na urina.

Considera-se existir microalbuminúria quando a taxa de excreção urinária de albumina for superior a 20 µg/min ou 30 mg/24h e igual ou inferior a 200 µg/min ou 300 mg/24h, sendo um indicador de início de dano glomerular (12). Na presença de valores superiores a 300 mg/24h temos presente proteinúria.

As alterações na função e estrutura renais ocorrem precocemente na Diabetes, sendo possível, atualmente, fazer-se o diagnóstico precoce da nefropatia diabética pela deteção da microalbuminúria.

3.2.4. Função Hepática

O fígado é o maior e mais complexo órgão do trato gastrointestinal. A sua avaliação pode ser feita pela determinação de uma série de analitos no soro, conhecidos como testes

da função hepática, muitos dos quais não são exclusivos do fígado, mas quando avaliados em conjunto permitem um diagnóstico preciso de alterações da função hepática.

A. Aspartato aminotransferase

As patologias do fígado são a causa mais importante do aumento das transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), no soro. A AST está amplamente distribuída pelos tecidos, nomeadamente pelo tecido hepático, cardíaco, muscular e renal, encontrando-se em níveis elevados na presença de determinadas doenças envolvendo estes mesmos. No momento seguinte a um enfarte do miocárdio a AST sérica aumenta, sendo que 2 dias após o enfarte atinge o seu valor máximo.

Os níveis séricos de AST podem também estar aumentados nas doenças hepatobiliares como a cirrose, o carcinoma metastático e a hepatite viral (13).

B. Alanina aminotransferase

A alanina aminotransferase encontra-se em maior quantidade no fígado sendo por isso utilizada no diagnóstico de doenças hepáticas como hepatite, cirrose, icterícia obstrutiva, carcinoma do fígado e no abuso crónico de álcool. Embora ambas as enzimas AST e ALT fiquem elevadas quando os processos patológicos afetam a integridade celular hepática, a ALT é a enzima mais específica do fígado persistindo um aumento da sua atividade durante mais tempo do que a atividade da AST (13).

C. Gama glutamil transferase

A gama glutamil transferase (γ GT) presente no soro advém principalmente do sistema hepatobiliar, sendo por esta razão um dos marcadores mais sensíveis no diagnóstico e monitorização das doenças hepatobiliares. Esta enzima também apresenta alteração precoce com os excessos alimentares, medicamentos e álcool (13).

D. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) está presente na maioria dos órgãos do corpo, estando localizada nas superfícies celulares e membranares da mucosa do intestino delgado, nos túbulos renais, no osso (osteoclastos), no fígado (hepatócitos), na placenta e nos leucócitos.

A ALP é determinada no diagnóstico e controlo de patologias hepáticas, ósseas e intestinais. Apresenta-se elevada em todas as formas de colestase, particularmente na icterícia obstrutiva. Esta enzima também se encontra elevada na doença de Paget,

hiperparatiroidismo, raquitismo e osteomalacia, assim como nas fraturas e nos tumores malignos. No entanto, é necessária uma atenção especial, pois em crianças e adolescentes e nas mulheres pós-menopausa é normal os valores encontrarem-se acima do normal: nas crianças e adolescentes devido ao aumento da atividade dos osteoblastos a seguir a um crescimento ósseo acelerado e nas mulheres pós-menopausa devido à osteoporose (13).

E. Lactato Desidrogenase

O aumento da enzima lactato desidrogenase (LDH) pode ser observado na doença hepática, mas esse aumento não é tão sensível como o aumento das transaminases.

A LDH está amplamente distribuída pelos tecidos, principalmente no fígado, coração, músculo e rim. No soro pode ser separada em cinco isoenzimas diferentes com base na sua mobilidade eletroforética, sendo que a elevação da isoenzima LD5 está associada a metástases hepáticas.

Os níveis mais elevados de LDH observam-se em doentes com anemia megaloblástica, enfarte do miocárdio, carcinoma disseminado, leucemia e traumatismos. Aumentos ligeiros estão relacionados com hepatite, cirrose, anemias hemolíticas, distrofia muscular e síndrome nefrótica (13).

F. Estudo das Proteínas Plasmáticas – Proteínas Totais

As proteínas plasmáticas são sintetizadas sobretudo no fígado, mas também podem ser sintetizadas nas células plasmáticas, gânglios linfáticos, baço e medula óssea. As proteínas que integram esse conjunto são: a albumina, as globulinas e ainda o fibrinogénio no caso do plasma. Em diversas patologias, tanto a concentração de proteínas totais como a percentagem representada por frações individuais, podem apresentar desvios dos valores normais.

A hipoproteinémia pode ser causada por cirrose hepática, mas também está presente em outras patologias e perturbações, tais como a perda de sangue, queimaduras graves, síndrome de retenção de sal e síndrome nefrótica. Por outro lado pode-se observar hiperproteinémia em casos de desidratação grave e no mieloma múltiplo.

As determinações das proteínas totais são utilizadas no diagnóstico e no tratamento de uma variedade de doenças que envolvam o fígado, os rins ou a medula óssea (14).

G. Albumina

A albumina é a proteína mais importante do organismo. Devido à sua elevada concentração plasmática e ao seu baixo peso molecular é também a proteína mais abundante no fluido extracelular. A principal função da albumina é a manutenção da pressão oncótica do plasma e o transporte de uma grande variedade de substâncias, tais como a bilirrubina, o cálcio, os ácidos gordos, iões metálicos tóxicos e um grande número de fármacos.

O aumento da concentração de albumina está presente em situações de desidratação aguda e não tem significado clínico. Por outro lado, a hipoalbuminémia tem como causa diversos fatores: síntese comprometida devido a doença hepática ou em consequência de uma captação proteica reduzida, catabolismo elevado provocado por lesões tissulares (queimaduras graves) ou inflamação, má-absorção de aminoácidos, (doença de Crohn), proteinúria em consequência de síndrome nefrótico e a perda de proteínas através das fezes (doença neoplásica) (14,15).

3.2.5. Função Excretora - Derivados do Catabolismo da Hemoglobina

A. Bilirrubinas

A bilirrubina forma-se no sistema reticuloendotelial pela degradação dos eritrócitos envelhecidos. Durante este processo, a porção heme da hemoglobina e de outras proteínas que contêm o heme, são removidas e metabolizadas em bilirrubina. Essa bilirrubina recém-formada circula no sangue ligada à albumina sérica (forma não-conjugada). É transportada pelo sistema porta até ao fígado, onde é conjugada com o ácido glucorónico (forma conjugada). A bilirrubina conjugada é excretada pelo fígado e acumula-se na vesícula biliar. Com a expulsão por parte da vesícula, esta bilirrubina alcança o trato intestinal, duodeno, sendo reduzida posteriormente no cólon, onde é metabolizada pelas bactérias da flora intestinal. Assim é formado o urobilinogénio, que é maioritariamente oxidado no intestino criando a urobilina, que é excretada nas fezes. Outra parte é reabsorvida no sangue e excretada novamente na bÍlis, sendo que só uma pequena quantidade é excretada pelos rins.

Existem portanto dois tipos de bilirrubina em circulação: a não conjugada, também chamada de bilirrubina indireta, e a conjugada, chamada de bilirrubina direta. As doenças que através de processos hemolíticos produzem a bilirrubina mais rapidamente do que o fígado consegue metabolizar, a imaturidade hepática e outras doenças onde os mecanismos de conjugação estejam alterados fazem com que os níveis de bilirrubina indireta aumentem em circulação.

A obstrução do canal biliar e as lesões da estrutura hepatocelular são responsáveis por aumentos em circulação, tanto da bilirrubina direta como da bilirrubina indireta. Nas situações de obstrução do canal biliar a bilirrubina conjugada regressa ao sangue e deposita-se na pele, nas membranas mucosas e na esclerótica, dando origem a um sinal clínico designado por icterícia, a excreção urinária aumenta e a urina torna-se escura enquanto as fezes ficam claras, devido ao aumento da bilirrubina direta no sangue (16,17,18).

3.2.6. Função Pancreática

A Pancreatite é uma inflamação do pâncreas causada por lesão das suas células devido à ativação de enzimas digestivas no parênquima pancreático. As manifestações de patologias pancreáticas são altamente variáveis, sendo de extrema importância o doseamento da Amilase e da Lipase como suporte para o diagnóstico e como apoio aos sinais clínicos.

A. Amilase

As α -amilases catalisam a hidrólise dos hidratos de carbono poliméricos mediante clivagem das ligações 1,4- α -glicosídicas. Existem dois tipos de α -amilases: a de tipo pancreático (tipo P) e a de tipo salivar (tipo S). A de tipo P pode ser atribuída quase em exclusivo ao pâncreas e, por isso, é específica do órgão. Por outro lado, a de tipo S tem origem em vários locais, para além da saliva pode ser encontrada nas lágrimas, no suor, no leite materno, no líquido amniótico, nos pulmões, nos testículos e no epitélio das trompas de Falópio.

As doenças pancreáticas apresentam poucos sintomas clínicos específicos, sendo a determinação da amilase muito importante no diagnóstico das doenças pancreáticas. Esta determinação é utilizada sobretudo no diagnóstico e monitorização terapêutica da pancreatite aguda e na fase inflamatória da pancreatite crónica. Pode ser observado uma hiperamilasémia em casos de insuficiência renal (como resultado de filtração glomerular reduzida), bem como nos tumores dos pulmões ou dos ovários, inflamação pulmonar, doenças das glândulas salivares, cetoacidose diabética, traumatismo craniano e intervenções cirúrgicas.

No entanto, para confirmar a especificidade pancreática é aconselhável a determinação de outra enzima que seja específica do pâncreas, como a lipase ou a α -amilase pancreática (13,19,20).

B. Lipase

O pâncreas é a principal fonte de lipase sérica. A lipase pancreática é uma glicoproteína e não está presente nas glândulas salivares. É definida como uma hidrolase de triglicerídeos que catalisa a clivagem dos triglicerídeos para diglicerídeos, com a formação subsequente de monoglicerídeos e ácidos gordos.

A determinação da atividade da lipase pancreática tem uma elevada especificidade e resposta rápida, sendo um dos parâmetros mais importantes para o diagnóstico diferencial de patologias do pâncreas.

Após uma pancreatite aguda, a atividade da lipase aumenta no espaço de 4 a 8 horas, atinge um pico após 24 horas e diminui de 8 a 14 dias (consultar Figura 1), sendo que aumentos prolongados sugerem um mau prognóstico ou um quisto pancreático (13,20).

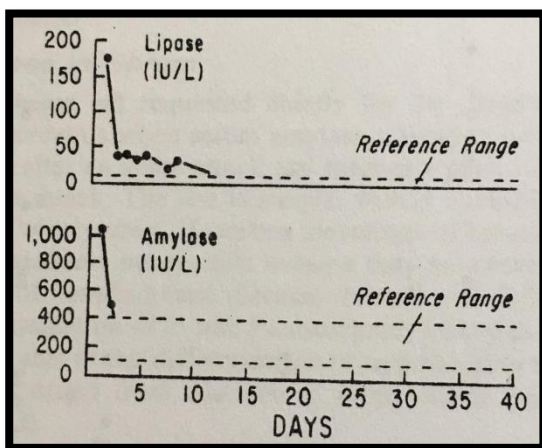


Figura 1 - Diferença entre a atividade da Amilase e da Lipase na Pancreatite (retirada de TIETZ *Fundamentals of Clinical Chemistry*).

3.2.7. Função Cardíaca e Muscular

Segundo a Organização Mundial de Saúde, no diagnóstico de Enfarte Agudo do Miocárdio é necessária a observação de pelo menos dois dos seguintes critérios: história de dor torácica, alterações no eletrocardiograma e/ou elevações dos marcadores cardíacos.

Um marcador cardíaco é definido como um teste clínico útil principalmente no Enfarte Agudo do Miocárdio, sendo que a sua utilidade está diretamente relacionada com a sensibilidade e especificidade do teste. Para que um marcador seja clinicamente útil ele deve ser sensível e específico. Deve também ser libertado rapidamente na circulação (diagnóstico precoce) e aí persistir por vários dias (semivida longa) (21).

A. Creatina Cinase

A enzima creatina cinase (CK) é um dímero composto de subunidades derivadas do músculo (M) ou do cérebro (B), sendo identificadas três isoenzimas: MM, MB, e BB. A CK sérica é predominantemente constituída pela isoenzima CK-MM.

Podem encontrar-se níveis séricos elevados de CK em doenças músculo-esqueléticas como a distrofia muscular, a isquemia cerebral, doença vascular cerebral e traumatismo craniano. Elevações significativas podem ser observadas após esforço físico intenso, nos pós-operatórios e queimaduras.

A utilização do doseamento da CK normal em paralelo com a fração MB da creatina cinase (CK-MB), no diagnóstico de enfarte do miocárdio, é a aplicação mais importante da determinação da CK em química clínica (21).

B. Fração MB da Creatina Cinase

A CK-MB encontra-se principalmente no músculo do miocárdio, daí ser de extrema importância o seu doseamento quando se suspeita de Enfarte do Miocárdio, tendo esta uma especificidade superior à da CK. Os valores de CK-MB são geralmente detetados a partir de 4 a 6 horas após um enfarte, atingem o seu pico entre as 12 e as 24 horas e retomam por fim ao seu valor normal entre 42 a 72 horas (21,22). (Figura 2)

Além disso, a CK-MB tem utilidade no diagnóstico precoce de reenfarte, o que é muito frequente nos 7 a 14 dias seguintes ao enfarte.

C. Mioglobina

A mioglobina é uma proteína que se localiza no citoplasma das células do miocárdio e nas células da musculatura esquelética, não tendo especificidade cardíaca. Tem um baixo peso molecular e a sua localização no citoplasma faz com que a sua libertação para a circulação ocorra logo após a lesão do miocárdio, mais rapidamente do que a CK-MB e as troponinas. Normalmente o pico de mioglobina após um enfarte do miocárdio ocorre entre 6 a 12 horas, sendo que após 24 horas os seus valores regressam a níveis normais. (Figura 2)

Embora a mioglobina possa oferecer alguma vantagem na deteção precoce de danos do miocárdio, torna-se limitada pela falta de especificidade. Uma vez que a concentração desta proteína no plasma pode aumentar não só na lesão do miocárdio, mas também em lesões do músculo-esquelético e na insuficiência renal, por redução da sua clearance, que ocorre neste órgão (21,22).

D. Troponina I

A troponina é uma proteína estrutural que forma o complexo contrátil regulador dos músculos esquelético e cardíaco. Encontra-se ao longo do filamento espesso das miofibrilas em conjunto com a tropomiosina. O seu complexo é constituído por três componentes polipeptídicos: Troponina-C, que se liga ao cálcio, Troponina-I, que inibe as contrações de actina-miosina na ausência de cálcio e a Troponina-T, que facilita a contração por ligação à tropomiosina. Isoformas de troponina C são expressas nos músculos esquelético e miocárdico, em contraste com as troponinas I e T que estão presentes unicamente nas células do miocárdio.

Uma vez interrompido o fluxo sanguíneo em qualquer ponto do miocárdio, dá-se a lise das fibras musculares e aumenta a concentração sérica dos polipeptídeos que compõem a troponina, elevando-se esta de 4 a 6 horas após a lesão, atingindo um pico entre as 12 e 16 horas. A quebra contínua do complexo das miofibrilas, provocado pela isquemia, leva a uma elevação prolongada da concentração de troponina no plasma, mantendo-se assim entre 7 a 14 dias. (Figura 2)

Por este motivo o doseamento das troponinas, no caso do SPC, da troponina I, é atualmente o melhor marcador para o diagnóstico de Enfarte Agudo do Miocárdio pois é mais específica e sensível do que as enzimas cardíacas tradicionais, como a CK ou a CK-MB (21,22,23,24).

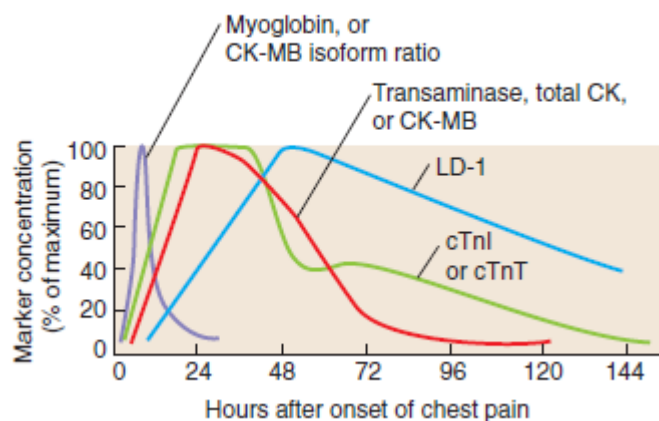


Figura 2 - Representação da cinética dos diferentes marcadores cardíacos após um enfarte agudo do miocárdio. (Retirada de *HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 22ªEd., 2011, p. 252).

3.2.8. Metabolismo do Ferro

A. Ferro

O ferro é um componente essencial da hemoglobina, da mioglobina (nas células musculares) e de certas enzimas (da maioria das células do corpo).

O ferro ingerido é essencialmente assimilado na forma de Fe^{2+} no duodeno e no jejuno superior, no entanto para ser absorvido tem de estar na forma reduzida ou ferrosa, a forma trivalente Fe^{3+} .

Depois de alcançar as células das mucosas, os iões de Fe^{2+} ligam-se às substâncias de transporte e antes de atravessarem para o plasma, os iões são oxidados pela ceruloplasmina a Fe^{3+} e ligados à transferrina. O transporte de iões de ferro no plasma sanguíneo ocorre através dos complexos transferrina-ferro, sendo assimilado diariamente cerca de 1mg de ferro e apenas é possível o transporte de um máximo de 2 iões de Fe^{3+} por cada molécula de proteína.

O ferro sérico liga-se quase na totalidade à transferrina, sendo portanto esta que leva o ferro sérico até aos locais de armazenamento e à medula óssea.

A diminuição do ferro sérico pode dever-se a perda por hemorragia, nefrose, carência dietética, infeções, tumores malignos, artrite reumatóide, entre outros. As determinações do ferro são de grande importância para o diagnóstico e tratamento de doenças como a anemia por deficiência de ferro, anemia microcítica, anemia macrocítica, anemia normocítica, doenças da medula óssea, lesão tóxica da medula óssea e nas doenças renais crónicas.

Por outro lado as situações clínicas que podem provocar aumento das concentrações de ferro são a anemia hemolítica, a intoxicação por chumbo, a necrose aguda de células hepáticas e a hemocromatose e siderose por transfusão (16,25).

B. Capacidade Total de Fixação do Ferro

O ferro total do organismo humano é cerca de 3 a 3,5 g. Desta quantidade apenas cerca de 2,5g se encontra nos eritrócitos ou nos respetivos percursos da medula óssea, sendo que o plasma contém apenas cerca de 2,5 mg de ferro.

O ferro no plasma é transportado sob a forma de Fe^{3+} , ligado à transferrina. Em situações normais apenas um terço dos locais de ligação da transferrina estão ocupados por Fe^{3+} . A quantidade adicional de ferro que pode ser ligada é a capacidade latente ou não saturada de ligação do ferro (UIBC). A soma do ferro sérico com a UIBC representa a capacidade total de fixação do ferro (TIBC).

A TIBC é portanto uma medição da concentração máxima de ferro que pode ser ligado e transportado pela transferrina. A TIBC varia nas perturbações do metabolismo do ferro. Na anemia por deficiência de ferro a TIBC encontra-se elevada e a saturação de transferrina baixa para 15% ou menos.

Valores baixos de ferro sérico associados a TIBC baixo são característicos de anemia por doenças crónicas, tumores malignos e infeções (16).

O TIBC é calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{TIBC} = [\text{Ferro Sérico}] + \text{UIBC} \quad (26)$$

C. % Saturação da Transferrina

Coeficiente importante na diferenciação dos diferentes tipos de anemia, mais útil que a determinação isolada do ferro, calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Saturação da Transferrina} = \frac{[\text{Ferro Sérico}]}{\text{TIBC} \times 100} \quad (16)$$

3.2.9. Metabolismo ósseo

As principais funções dos ossos são: mecânicas, de proteção e metabólicas. O osso humano é metabolicamente ativo e sofre um processo contínuo de remodelação ao longo da vida. Essa remodelação é necessária tanto para manter a integridade estrutural do esqueleto como para cumprir as suas funções de armazenamento de cálcio e fósforo. A concentração plasmática de cálcio, fósforo e magnésio é dependente do balanço entre a deposição e a reabsorção mineral óssea, absorção intestinal e excreção renal (27).

A. Cálcio total

O cálcio é o 5º elemento mais abundante, e o catião mais prevalente no organismo humano, encontrando-se maioritariamente nos ossos sob a forma de hidroxapatite. O restante cálcio encontra-se distribuído pelos vários tecidos e líquidos extracelulares, onde desempenha um papel crucial em muitos processos de manutenção da vida. Entre essas funções do cálcio destaca-se o seu envolvimento na coagulação sanguínea, na condução neuromuscular, na excitabilidade do músculo cardíaco e esquelético, na ativação enzimática e na conservação da integridade e permeabilidade da membrana celular.

Os níveis séricos de cálcio e, conseqüentemente, o teor deste mineral no organismo são controlados pela hormona da paratiróide (PTH), pela calcitonina e pela vitamina D.

Aumentos da PTH ou da vitamina D são normalmente responsáveis por hipercalcemia. Também se pode observar níveis séricos de cálcio aumentados no mieloma múltiplo e noutras doenças neoplásicas.

Por outro lado, a hipocalcemia pode ser observada em casos de hipoparatiroidismo, nefrose e pancreatite (27).

B. Cálcio ionizado

O cálcio ionizado (Ca^{2+}) é a forma fisiologicamente ativa de cálcio e compreende cerca de 45% do cálcio total do plasma. O Ca^{2+} é essencial para a contractilidade da musculatura vascular lisa, desempenha um papel vital na função cardiovascular, na função muscular, na função nervosa e na ossificação. Constitui também um cofator em muitas reações enzimáticas e hormonais.

No SPC é de extrema importância o doseamento do Ca^{2+} devido ao diagnóstico e seguimento de patologias da tiróide. Para além destas patologias o seu doseamento é também importante nos desequilíbrios da vitamina D, doença renal, pancreatite, efeitos de medicamentos, anomalias de magnésio ou fósforo, malignidade ou sarcoidose. Uma diminuição extrema de Ca^{2+} poderá causar sintomas neuromusculares, tetania, alterações do estado mental, apoplexias, arritmias e colapso cardíaco (27).

C. Fósforo

O fósforo, na forma orgânica e inorgânica, é um elemento muito importante e está amplamente distribuído no organismo. Este encontra-se na sua maioria no osso sob a forma de hidroxiapatite, no entanto pode encontrar-se também ligado a proteínas, complexado com o sódio, cálcio, magnésio e encontra-se em menor quantidade na sua forma livre.

Na maioria das células, o fósforo é orgânico e está envolvido no metabolismo intermédio dos hidratos de carbono, incorporado nos ácidos nucleicos e ATP. A diminuta quantidade de fósforo orgânico extracelular encontra-se quase exclusivamente sob a forma de fosfolípidos. No sangue o fósforo encontra-se sob a forma de fosfato inorgânico e de ácido fosfórico organicamente ligado.

Na hiperfosfatemia, um aumento do nível de fósforo provoca uma redução do nível de cálcio, sendo este mecanismo influenciado por interações entre a paratormona e a vitamina D. A hiperfosfatemia pode ser provocada pelo hipoparatiroidismo, intoxicação por vitamina D e insuficiência renal associada a uma redução da taxa de filtração glomerular.

A hipofosfatemia ocorre no raquitismo, hiperparatiroidismo e síndrome de Fanconi (27).

D. Magnésio

O magnésio (Mg^{2+}) é o quarto elemento mais abundante no corpo humano e é cofator de muitos sistemas enzimáticos, sendo que todas as reações enzimáticas que dependem de ATP requerem Mg^{2+} como cofator do complexo ATP-magnésio.

Cerca de 55% está presente nos ossos associado ao cálcio e ao fósforo e no fluido extracelular só se encontra uma pequena quantidade. O magnésio ingerido é absorvido no intestino e a quantidade absorvida é inversamente proporcional à quantidade total de magnésio ingerida. Os rins controlam eficazmente a homeostasia do magnésio através da reabsorção tubular, que conserva o magnésio quando a ingestão é baixa e excreta o excesso quando a ingestão é alta.

Aumentos nas concentrações de magnésio são observados na insuficiência renal aguda e crônica, na acidose diabética aguda e desidratação. A hipermagnesémia tem um efeito depressor a nível do sistema nervoso central, causando apatia e insuficiência respiratória.

A hipomagnesémia pode ser observada no alcoolismo crônico, na má absorção, na diarreia grave, na pancreatite aguda, na terapêutica diurética, na terapêutica com fluidos parentéricos prolongada sem suplementação de magnésio, em doenças renais como a glomerulonefrite e deficiências da reabsorção tubular. A diminuição das concentrações séricas de magnésio pode ter como resultado tetania, convulsões e arritmias cardíacas (27).

3.2.10. Equilíbrio Hidro-eletrolítico

A função dos quatro eletrólitos principais, sódio (Na^+), potássio (K^+), cloro (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) é a manutenção da pressão osmótica e a distribuição da água nos vários compartimentos corporais.

Além da homeostase da água, esses eletrólitos desempenham um papel importante na manutenção do pH, na manutenção da função cardíaca e muscular, em reações de oxidação-redução e como cofatores para enzimas. Deste modo, concentrações anormais destes eletrólitos podem ser a causa ou consequência de uma grande variedade de distúrbios, daí a sua avaliação ser muito importante em química clínica (28).

A. Sódio

O sódio é o catião mais abundante nos espaços extracelulares e principal determinante da regulação osmótica extracelular, desempenhando um papel importante na determinação do volume de líquido corporal.

Os rins são os principais reguladores do sódio e, conseqüentemente, do volume de água. Existem duas hormonas reguladoras, a aldosterona e a hormona antidiurética (ADH), que regulam a função renal e, por sua vez, o equilíbrio de sódio.

A aldosterona estimula os rins a reabsorverem o sódio, por outro lado, a ADH estimula os rins a reabsorverem a água.

As concentrações alteradas de Na^+ resultam de diversas condições clínicas, tais como, colapso cardíaco congestivo, doença do fígado (cirrose), doença renal, distúrbios neuropsiquiátricos (que causam uma ingestão anormal de fluídos), terapia intravenosa com fluídos, perda excessiva de fluídos (vômitos, diarreia, insolação), terapia com medicamentos (diuréticos), diabetes *mellitus* (diurese osmótica) e disfunção de hormonas como a ADH. Uma concentração extremamente anormal de Na^+ no plasma poderá ser responsável por alterações do estado mental, letargia, coma, apoplexia, conduzindo a hemorragia cerebral ou mesmo à morte (28).

B. Potássio

O potássio é o principal catião intracelular e desempenha um papel de extrema importância na manutenção do potencial de membrana celular no tecido neuromuscular.

A maior parte do K^+ é excretada pelo rim, este é responsável por excretar 90% do K^+ ingerido, sendo o restante eliminado através das fezes.

As concentrações elevadas de K^+ são geralmente causadas por insuficiência ou falha renal, reposição excessiva de potássio e como efeito de medicamentos diuréticos que inibem a eliminação do potássio.

As concentrações baixas de K^+ são causadas por perda gastrointestinal, insuficiência dietética ou efeito de medicamentos, como a maioria dos diuréticos (28).

C. Cloro

O cloro é o principal anião extracelular do organismo e desempenha um importante papel na manutenção da neutralidade elétrica e na osmolalidade normal bem como participa na regulação do equilíbrio ácido-base.

Os rins são os principais reguladores de cloro no organismo e os níveis séricos de cloro refletem normalmente aumentos e reduções de sódio.

A hipoclorémia deve-se a uma perda excessiva de cloro como acontece nas perdas gastrointestinais, na cetoacidose diabética e nas doenças renais que cursam com perda de sódio. A hiperclorémia pode resultar da acidose metabólica, por perda excessiva de bicarbonato (28).

3.2.11. pH e Gases do sangue

A determinação dos gases sanguíneos desempenha um papel fundamental na detecção de desequilíbrios ácido-base e na monitorização da terapêutica. O tratamento clínico de distúrbios respiratórios e metabólicos depende de medições rápidas e precisas do pH, dióxido de carbono (CO₂) e oxigénio (O₂) (28).

A. pH

O pH expressa a atividade dos iões de hidrogénio numa solução como o logaritmo negativo da concentração hidrogeniónica. Sendo o ião hidrogénio o elemento determinante da acidez do sangue ou do plasma, o pH é clinicamente significativo como uma forma de se determinar os distúrbios ácido-base.

O metabolismo celular normal necessita de um ambiente exigente onde a concentração hidrogeniónica deverá ser mantida dentro de limites rigorosos, variando o intervalo normal de pH do sangue humano entre 7,35 e 7,45. A equação de *Henderson-Hasselbalch* descreve a forma como o pH expressa a interação do ácido e da base no sangue:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log\left(\frac{\text{base}}{\text{ácido}}\right)$$

A acidose (pH baixo) é causada por falha respiratória (pCO₂ elevada) ou por causas metabólicas, como a cetoacidose, acidose láctica, uremia, diarreia grave, hipoaldosteronismo, doença renal tubular, efeitos de medicamentos e envenenamento por vários agentes específicos. A alcalose (pH elevado) é causada pela hiperventilação (pCO₂ baixa) ou por causas metabólicas, como vômitos excessivos, lavagem gástrica, efeitos de alguns medicamentos, hiperadrenocorticismos e esgotamento de potássio (28).

B. Tensão de Dióxido de Carbono

O dióxido de carbono é produzido durante o metabolismo celular normal e é libertado para a corrente sanguínea onde é transportado até aos rins e pulmões para ser excretado. O CO₂ é transportado pelo sangue sob a forma de bicarbonato (HCO₃⁻), CO₂ dissolvido e ácido carbónico (H₂CO₃).

Os níveis de HCO₃⁻, H₂CO₃ e CO₂ dissolvido têm um papel muito importante na manutenção do pH do sangue sendo que a melhor forma para descrever esta relação é através da equação de *Henderson-Hasselbalch*.

Em conjunto, o pH e a $p\text{CO}_2$, são a melhor ferramenta de diagnóstico para a avaliação da função respiratória. Um aumento no valor de tensão de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) e uma redução no pH indica uma acidose respiratória (o CO_2 é retido nos pulmões). Uma redução no valor de $p\text{CO}_2$ com aumento do pH indica alcalose respiratória (pulmões a expirar demasiado CO_2 em relação à quantidade produzida) (28).

C. Tensão de Oxigénio

O oxigénio é essencial para o metabolismo de células e tecidos no organismo, sendo o sistema cardiopulmonar responsável pelo transporte de oxigénio para as células. A avaliação da $p\text{O}_2$ reflete a capacidade dos pulmões em fornecer oxigénio ao sangue. Em casos de respiração adequada ocorrem situações de hipóxia (O_2 baixo) devido a doenças pulmonares parenquimatosas como pneumonia, asma, edema pulmonar e fibrose pulmonar causadas por *shunting* pulmonar no sangue. Situações de tensão de oxigénio ($p\text{O}_2$) extremamente baixa é um estado potencialmente fatal e deve ser tratado imediatamente (28).

D. Gasometria

Por gasometria entende-se a determinação de gases no sangue arterial, sendo útil para a avaliação do equilíbrio ácido-base. Utiliza como amostra sangue arterial e no IPOCFG as amostras são colhidas nas enfermarias do hospital por um Médico, em seringas heparinizadas e enviadas ao laboratório, no menor tempo possível, sendo os doseamentos efetuados no gasómetro.

Trata-se de uma análise com uma interpretação exigente, estando os seus resultados relacionados com diversas patologias. Como é exemplo a tabela abaixo indicada:

Tabela IV - Alterações do equilíbrio ácido-base.

Alteração	Carência primária	pH	HCO_3^-	$p\text{CO}_2$
Acidose Metabólica	HCO_3^-	↓	↓	↓
Alcalose Metabólica	HCO_3^-	↑	↑	↑
Acidose Respiratória	CO_2	↓	↑	↑
Alcalose Respiratória	CO_2	↑	↓	↓

3.3. Técnicas Manuais

No SPC são executados os seguintes testes manuais de aglutinação baseados numa reação antigénio-anticorpo:

A. Reação de Weil-Félix

Teste de aglutinação em que os antigénios febris inativos de *Proteus* (*Proteus* OX19) aglutinam com anticorpos específicos que se desenvolvem durante algumas infeções febris como a Rickettsiose (29).

B. Reação de Widal

Teste de aglutinação que utiliza várias suspensões de *Salmonellas* inativas, com os antigénios somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) de *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi* que aglutinam na presença do anticorpo homólogo quando presente nas amostras (30).

C. Reação de Waaler-Rose

Os fatores reumatóides são imunoglobulinas presentes no soro de pessoas com poliartrite reumatóide e que aglutinam os glóbulos vermelhos de carneiro cobertos com IgG de coelho, pois os fatores reumatóides são auto anticorpos dirigidos contra o fragmento Fc das IgG de humanos e animais.

A reação de Waaler-Rose pesquisa o fator reumatóide por uma reação de aglutinação, na presença de fatores reumatóides de hemácias de carneiro, estabilizadas e sensibilizadas com γ – globulinas de coelho, contra hemácias de carneiro, isto é, como antigénio utilizam-se as IgG de coelho que revestem glóbulos vermelhos de carneiro (31, 32).

D. LE Teste

O Lúpus Eritematoso Sistémico é uma doença inflamatória de origem autoimune, sendo que os anticorpos mais associados com o Lúpus são os dirigidos contra a desoxirribonucleoproteína (DNP). O LE é um teste de aglutinação para a deteção presuntiva de Lúpus Eritematoso Sistémico no soro humano, que deteta e quantifica os anticorpos anti-DNA de cadeia dupla (33).

E. Teste rápido para Mononucleose Infeciosa

Teste semi-quantitativo para a detecção de anticorpos heterófilos presentes na mononucleose infecciosa. Esta envolve os tecidos reticuloendoteliais e é causada pelo vírus do *Epstein Barr*. O teste baseia-se na aglutinação dos anticorpos heterófilos do doente com as partículas de látex do reagente sensibilizado com o antígeno da mononucleose (34).

F. Brucellacapt

A brucelose humana é uma zoonose presente em reservatórios de animais domésticos e selvagens e causada por bactérias do género *Brucella*. O Brucellacapt é um teste de aglutinação para a detecção de anticorpos aglutinantes e também anticorpos incompletos ou não aglutinantes. É constituído por microplacas com tiras que têm poços revestidos com imunoglobulinas anti-imunoglobulinas humanas, que permitem detetar os anticorpos anti-*Brucella* (35).

G. Serodiagnóstico da Sífilis – RPR

A infeção sífilítica causada pelo *Treponema pallidum* conduz ao aparecimento de anticorpos designados por reaginas. O RPR-nosticon® é um teste de floculação não treponémico macroscópico e é utilizado para detetar as reaginas. Quando estes anticorpos são detetados no soro ou no plasma é necessário proceder à confirmação da Sífilis por um método treponémico (36).

4. Microbiologia

Uma das principais preocupações na área da saúde é a alta incidência de infecções nosocomiais, infecções adquiridas em ambiente hospitalar, durante o internamento ou após a alta do doente quando este esteve hospitalizado ou foi submetido a procedimentos médicos.

Os principais agentes responsáveis por infecções nosocomiais são as bactérias, e em segundo lugar os fungos. Ambos podem fazer parte da flora humana normal e em indivíduos saudáveis não traduzir risco, no entanto, podem-se tornar oportunistas e causar infecções em indivíduos com compromisso imunitário (37).

O setor de microbiologia do SPC está sob a responsabilidade da Dra. Maria Alexandre Vaz Mendes, Técnica Superior de Saúde Especialista em Análises Clínicas. Este setor processa todos os produtos biológicos em que se pretende uma avaliação microbiológica, de acordo com o pedido do clínico. A sua grande maioria são estudos bacteriológicos das mais variadas proveniências, em menor números os estudos micológicos e apenas um número residual de estudos parasitológicos.

Em função da amostra, o seu processamento sofre ligeiras alterações com o objetivo final de identificar o microrganismo em causa e determinar o seu Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA), no menor tempo possível.

4.1 Exame Macroscópico, Microscópico e Cultural de Produtos Biológicos

A. Exame Macroscópico

Quando as amostras chegam ao laboratório de microbiologia é importante o exame macroscópico, uma vez que em certas amostras podem-se observar características que levam à sua rejeição, como por exemplo na expetoração em que amostras de saliva, sem muco, não são representativas. Trata-se de um exame em que se visualiza e valoriza o aspeto do produto enviado – cor, consistência, presença de sangue, cheiro, etc. Este tem grande importância em alguns produtos como expetoração, urina, pús, entre outros.

B. Exame Direto a Fresco

O Exame Direto a Fresco consiste na observação direta da amostra, entre lâmina e lamela ao microscópio ótico, sem fixação ou coloração, permitindo a observação de microrganismos vivos, preservando a sua morfologia e mobilidade. Também se observam

outras características, como o tipo de agrupamento das bactérias, ou a presença de outros elementos celulares.

C. Coloração de Gram

A coloração pela técnica de Gram, descrita na tabela V, pode ser feita através de esfregação direto do produto ou a partir do resultado da cultura. Permite diferenciar as bactérias com base na diferente composição da parede celular, a qual é formada por um complexo macromolecular denominado peptidoglicano e uma membrana plasmática. As bactérias de gram positivo têm uma parede relativamente simples, composta por uma espessa camada de peptidoglicano, em que as moléculas se encontram ligadas por ligações cruzadas, formando uma rede rígida e sólida. Por outro lado, as bactérias gram negativas têm uma quantidade mais pequena de peptidoglicano e a sua parede celular não é tão espessa, mas a sua estrutura é mais complexa devido à presença de uma membrana externa, constituída por lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolípidos.

Nas bactérias Gram positivo, o violeta de genciana penetra na parede bacteriana e, após a adição do soluto de lugol, forma um complexo com o iodo desta solução. Quando é aplicado o diferenciador (álcool-acetona), os complexos formados ficam retidos no interior da espessa camada de peptidoglicano, característica das bactérias de Gram positivo. Por este motivo não são facilmente descoradas e retêm este primeiro corante, adquirindo uma cor roxa.

Relativamente às bactérias de Gram negativo, com a fina camada de peptidoglicano, os complexos de violeta de genciana e iodo são removidos quando se aplica o diferenciador, e adquirem a cor rosa pela retenção do segundo corante, a fucsina diluída (38).

Após fixação, a observação do esfregação ao microscópio ótico permite fazer a distinção entre bactérias Gram positivo e Gram negativo e ainda visualizar a forma das bactérias (cocos e bacilos), bem como o tipo de agrupamento, pares, em cacho ou cadeia, caso exista.

Tabela V - Técnica de coloração de Gram.

Etapa		Tempo
1º Corante	Violeta de Genciana	1 minuto
Mordente	Soluto de Lugol	30 segundos
Diferenciador	Álcool-acetona	Gota a gota até descorar
Lavar em água corrente		
2º Corante	Fucsina Diluída	30 segundos
Lavar e Secar		

D. Coloração de Kinyoun

A coloração pela técnica de Kinyoun, descrita na tabela VI, é a coloração usada para observação de *Mycobacterium sp.* e *Nocardia sp.*

Nestas bactérias a estrutura da parede celular é semelhante às bactérias Gram positivo, mas possuem uma membrana externa constituída por ácidos micólicos, que as impermeabiliza aos corantes aquosos utilizados na coloração de Gram. Sendo que os corantes utilizados na coloração de Kinyoun têm grupos fenol, o que lhes permite transpor a membrana externa e a parede celular das micobactérias (38). As micobactérias retêm o corante, devido a esta característica específica e à sua morfologia de bacilos são designadas por bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR).

Tabela VI - Técnica de coloração de Kinyoun.

Etapa		Tempo
1° Corante	Carbolfucsina	4 minutos
Lavar em água corrente		
Descorante	Ácido-álcool	5 segundos
Lavar em água corrente		
2° Corante	Verde-brilhante	30 segundos
Lavar e Secar		

E. Meios de Cultura

Os meios de cultura podem ser líquidos, sólidos (com 1,5% de agar) ou semissólidos (com 0,5% de agar).

Estes meios podem ser seletivos, destinados à recuperação de microrganismos que podem estar presentes numa amostra polimicrobiana, sendo suplementados com inibidores que suprimem o crescimento dos microrganismos não desejados (ex. CNA, Hektoen), não seletivos, os quais permitem o crescimento da maioria dos microrganismos (ex. Gelose de sangue) ou diferenciais, que através da adição de determinados substratos, promovem a detecção de características bioquímicas importantes numa identificação preliminar (ex. Hektoen).

- Meios Sólidos:

COS (Gelose Columbia suplementada com 5% sangue de carneiro)

Este meio permite o crescimento e isolamento de microrganismos não fastidiosos e fastidiosos, pois é altamente nutritivo e adaptado para cultura da maioria das espécies bacterianas. O sangue de carneiro fornece o fator X (heme), o que permite a observação da presença ou ausência de hemólise e do tipo de hemólise (39).

CNA (Gelose de sangue, Colistina e Ácido Nalidíxico)

O meio CNA é uma gelose de sangue com colistina e ácido nalidíxico e é um meio seletivo para as bactérias de Gram positivo, pois os antibióticos presentes inibem o crescimento das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas spp.* (39).

PVX (Gelose chocolate + PolyViteX)

O meio PVX é um meio enriquecido, não seletivo, obtido pela adição de sangue de carneiro aquecido a 80°C (hemólise dos eritrócitos). Esta gelose é enriquecida com os fatores X (heme) e V (NAD) e favorece o crescimento de *Neisseria spp.* e *Haemophilus spp.* (39).

CLED (Cistina, Lactose, Déficit em Eletrólitos)

O meio CLED é um meio não seletivo, diferencial e devido à composição com lactose e azul de bromotimol (indicador de pH), permite diferenciar os microrganismos fermentadores dos não fermentadores de lactose através da variação da cor do meio de cultura. Sendo assim, os microrganismos fermentadores de lactose formam colônias amarelas e o meio de cultura também se torna amarelo. Por outro lado, os microrganismos não fermentadores formam colônias azuis ou verdes, não alterando a cor do meio. A deficiência em eletrólitos inibe o “swarming” dos *Proteus spp.* (39).

SGC2 (Gelose Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol)

O meio Sabouraud é amplamente utilizado para cultura e isolamento de fungos. A elevada concentração de glicose proporciona uma fonte de energia para o desenvolvimento dos fungos, enquanto a maioria das bactérias não tolera esta condição. O seu baixo pH é também ideal para os fungos, sendo prejudicial para as restantes bactérias.

Por outro lado, a adição de gentamicina inibe o crescimento de bactérias Gram negativo e a adição de cloranfenicol inibe o crescimento de uma gama ampla de bactérias Gram negativo e Gram positivo. Este meio é utilizado para verificar a presença de leveduras, permanecendo em incubação durante vários dias (40).

HEK (Gelose Hektoen)

A gelose Hektoen é um meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. Este meio tem na sua constituição sais biliares, os quais inibem as bactérias Gram positivo e retardam o crescimento de algumas *Enterobacteriaceae*. Este meio

contém também lactose, sacarose e salicina, para diferenciação dos microrganismos fermentadores dos não fermentadores de lactose através da cor das colónias e do meio adjacente às mesmas. A grande concentração de lactose permite a visualização de microrganismos entéricos e minimiza o problema da fermentação tardia da lactose (39).

XLD (Desoxicolato-Lisina-Xilose)

O meio XLD é um meio usado para o isolamento e diferenciação de bactérias entéricas de Gram negativo, como *Shigella* e *Salmonella spp*, a partir de amostras de fezes. Este meio utiliza o desoxicolato de sódio como agente seletivo, o qual inibe o crescimento das bactérias de Gram positivo.

A presença de xilose permite diferenciar as espécies de *Shigella*, que não fermentam este açúcar (ao contrário da grande maioria dos elementos entéricos). A lisina permite que a *Salmonella* seja diferenciada dos outros elementos não patogénicos, pois sem a presença de lisina as espécies de *Salmonella* fermentariam rapidamente a xilose. Quando estas bactérias esgotam a fonte de xilose, utilizam a enzima lisina descarboxilase para fermentar a lisina, o que alcaliniza novamente o meio. Este meio possui ainda tiosulfato de sódio e citrato de amónia férrico, para permitir a visualização do H₂S produzido, que resulta na formação de colónias com centros negros. A degradação da xilose, lactose e sacarose gera produtos ácidos, que na presença do indicador de pH vermelho de fenol provoca uma alteração de cor do meio de vermelho para amarelo, o que acontece na presença de outros elementos entéricos que não *Shigella* e *Salmonella* (41).

CAM (Gelose *Campylobacter*)

O meio de *Campylobacter* é um meio seletivo para o isolamento de espécies de *Campylobacter*, a partir de amostras fecais. A incorporação no meio de agentes antimicrobianos inibe a flora fecal normal, tais como a vancomicina que inibe muitas espécies de Gram positivo e a anfotericina B que funciona como um agente antifúngico.

A seletividade deste meio depende, além disso, de uma incubação a 42°C numa atmosfera microaerofílica, durante 48 horas (42).

MH (Gelose Muller-Hinton)

A gelose Muller-Hinton é um meio não seletivo usado principalmente para os estudos de suscetibilidade aos antimicrobianos. Pode ser suplementado com 5% de sangue de carneiro para os microrganismos mais fastidiosos (39).

SCS (Gelose Schaedler)

A gelose Schaedler é um meio não seletivo usado para o isolamento de anaeróbios estritos fastidiosos e também de aeróbios fastidiosos. Contém 5% de sangue de carneiro e fatores de crescimento necessários para determinados anaeróbios. Por outro lado contém também o aditivo de vitamina K1, que é crucial para o crescimento de determinados anaeróbios e o cloreto de sódio, que permite a manutenção do equilíbrio osmótico (40).

O tipo de microrganismos recuperados é dependente do ambiente utilizado no processo de incubação. Para anaeróbios, a incubação deve ser feita a 37°C em condições de anaerobiose, durante pelo menos 48 horas. Por outro lado, para aeróbios, a incubação deve ser feita a 37°C em condições de aerobiose, durante pelo menos 24 horas.

LJ (Löwenstein-Jensen)

O meio de LJ é usado para cultura de micobactérias, nomeadamente de *Mycobacterium tuberculosis*. Este meio é suplementado de forma a suportar o crescimento de micobactérias durante um período de tempo longo. O glicerol e a mistura de ovo fornecem os ácidos gordos e as proteínas necessárias para o metabolismo das micobactérias. Por outro lado, o verde malaquite inibe a maioria das bactérias contaminantes (43).

Este meio encontra-se inclinado em tubo de vidro e deve ser incubado a 37°C durante seis semanas, sendo vigiado regularmente ao longo do tempo.

Sistema Mycoline

O sistema Mycoline é constituído por dois meios de cultura, inseridos num tubo, que contém uma lâmina de cada lado, coberta com cada um dos meios de cultura. É utilizado para cultura seletiva de leveduras, dermatófitos ou outros fungos. Um dos lados é constituído por Sabouraud-Gentamicina-Cloranfenicol, onde a presença de peptonas e de glicose favorecem o desenvolvimento dos fungos e a gentamicina inibe a maior parte das bactérias Gram positivo e Gram negativo. O outro lado é constituído por Sabouraud-Cloranfenicol-Actidiona, sendo que a cultura em meio com actidiona permite o isolamento dos fungos dermatófitos. A presença de actidiona inibe algumas espécies de leveduras.

- Meios Líquidos:

Meio BHI (Brain-heart Infusion)

O meio BHI é um meio nutritivo que contém infusões de tecido cerebral e cardíaco, bem como peptonas, que fornecem proteínas e outros nutrientes necessários para apoiar o

crescimento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos, incluindo bactérias anaeróbias e bactérias aeróbias. Utiliza-se geralmente como meio de enriquecimento e a adição de 5 – 10% de sangue e antibióticos como cloranfenicol e gentamicina tornam o meio seletivo para fungos (39).

KCS (Caldo Schaedler com vitamina K3)

O caldo Schaedler é usado para a cultura de microrganismos fastidiosos, tanto aeróbios como anaeróbios. Este caldo é o meio mais eficaz para o crescimento de bactérias anaeróbias estritas quando incubadas em atmosfera anaeróbia.

No entanto, o tipo de microrganismo recuperado deste meio depende das condições de incubação do mesmo em aerobiose, em anaerobiose ou em atmosfera microaerofílica, dependendo do que se pretende (40).

Caldo Selenito

Os meios de enriquecimento são muito importantes para a deteção de microrganismos patogénicos em amostras fecais, pois os microrganismos patogénicos representam apenas uma pequena percentagem da flora presente. Este caldo é um meio de enriquecimento que permite o isolamento de *Salmonella*. Tem na sua constituição selenito que inibe o crescimento de muitas bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, incluindo enterococos e coliformes e outras espécies bacterianas que estão normalmente presentes nas fezes (40).

Caldo GN

O caldo GN é um meio de enriquecimento para *Enterobacteriaceae*, especialmente *Shigella spp.* e *Salmonella spp.*. Este meio tem na sua constituição citrato e desoxicolato que atuam como agentes seletivos e inibem o crescimento da maioria das *Enterobacteriaceae*, da flora indígena habitual do intestino e de todos os tipos de bacilos formadores de esporos. Também tem manitol na sua constituição, o qual promove seletivamente o crescimento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, que o metabolizam.

Neste meio líquido, quando se visualiza turvação, deve ser feita a subcultura para meio sólido entre 6 a 12 horas, pois é o tempo médio de inibição de outras estirpes, como *Proteus spp* (39).

Meio para hemoculturas

Para hemoculturas são utilizados frascos que contêm um meio líquido rico em tripticase soja, resinas e antibióticos, para além de um sensor químico que permite detetar aumentos de CO₂ produzido pelos microrganismos em crescimento, por método de fluorescência. Após a inoculação do meio com a amostra de sangue do doente, o frasco é colocado no equipamento BD Bactec™, e a deteção do crescimento bacteriano é efetuada automaticamente (medição do CO₂ produzido e modificações de pH, que resulta da metabolização dos substratos presentes no meio, pelos microrganismos). No SPS existem frascos de hemoculturas para aeróbios e fungos, para anaeróbios e para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* (44). Sendo que o frasco para hemocultura incuba 7 dias para aeróbios e anaeróbios, incuba 14 dias para fungos e no caso da pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* incuba 42 dias.

4.2 Exame Bacteriológico e Micológico de Produtos Biológicos

A. Urina

As infeções do trato urinário estão entre as doenças infecciosas mais comuns na prática clínica sendo a amostra de urina a mais frequente no SPC.

As infeções do trato urinário são divididas quanto à topografia, em superiores e inferiores. As infeções superiores envolvem o parênquima renal (pielonefrite) ou ureteres (ureterites), por outro lado as infeções inferiores envolvem a bexiga (cistite), a uretra (uretrite) e, nos homens, a próstata (prostatite) e o epidídimo (epididimite) (45).

Quando há suspeita de infeção urinária a amostra de urina é enviada ao laboratório em contentor estéril. A sua colheita deverá ser, preferencialmente, a primeira urina da manhã, colhida por micção de jato médio e após a correta higienização com limpeza metódica do meato uretral com gaze embebida em água e sabão, de seguida lavar só com água esterilizada e secar. Outros métodos de colheita de urina possíveis são: punção de cateter urinário, punção supra-púbica, saco coletor em crianças, e drenagem de nefrostomia/ureterostomia, sempre seguindo as normas corretas e específicas para estas colheitas (46).

O processamento laboratorial da amostra de urina compreende duas fases: a Urocultura e a Sumária de urina ou Urina tipo II.

- Urocultura

A urocultura consiste no exame bacteriológico de urina para a quantificação dos microrganismos presentes, deve ser realizada primeiramente para evitar contaminações e o tratamento da amostra deve ser feito rapidamente após a colheita. A urina é semeada segundo dois planos perpendiculares, em dois meios de cultura diferentes, CNA (Colistina e Ácido Nalidíxico) e CLED (Cistina, Lactose, Défice em Eletrólitos), como exemplificado na Figura 3. Para tal é utilizada uma ansa calibrada de 10 µL, sendo que as placas são incubadas em atmosfera de aerobiose a 37°C, entre 18 a 24 horas.

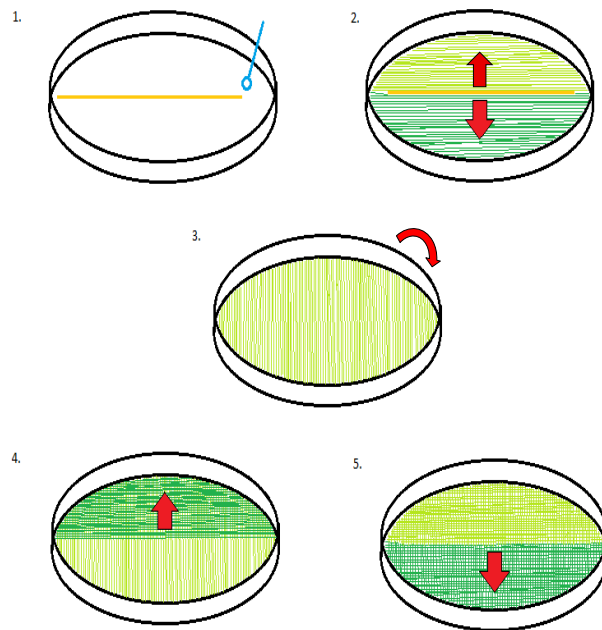


Figura 3 - Esquema da técnica de sementeira de urina segundo dois planos perpendiculares.

O meio CLED é um meio não seletivo usado na análise de urina e permite o isolamento dos microrganismos mais frequentes de infecção urinária. É precisamente neste meio que se realiza a análise quantitativa, sendo consideradas positivas as amostras que tenham uma quantidade de colónias superior a 10^5 UFC (unidades formadoras de colónias) / ml. Como a urocultura se efetuou com uma ansa de 10 µl, devem crescer em cultura pelo menos 1000 colónias para que esta seja considerada positiva. A amostra é considerada negativa quando o crescimento bacteriano é inferior a 10^5 UFC/ml. Quando se verificar crescimento de três ou mais estirpes bacterianas, possivelmente devido a uma má técnica de colheita da urina, considera-se que a amostra é polimicrobiana e aconselha-se ao clínico uma nova colheita de amostra de urina (46).

A partir das amostras positivas é feita a identificação dos microrganismos em causa e o seu respetivo TSA.

Microrganismos mais frequentes:

Em infecções do trato urinário superior e inferior em doentes em ambulatório: *E. coli*, *S. aureus* e *Enterococcus*, *Proteus spp.* e *N. gonorrhoeae*.

Em infecção hospitalar do trato urinário: *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Imagem Ilustrativa na Figura 4). *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Candida spp.*.

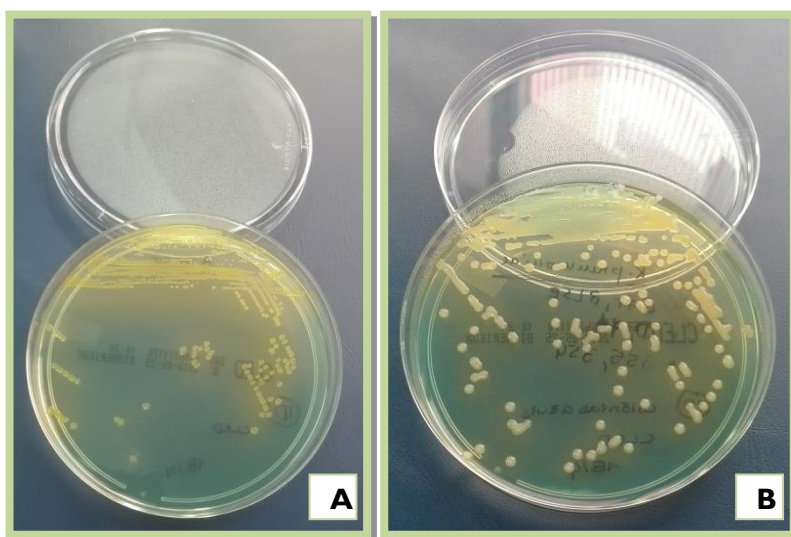


Figura 4 - Microrganismos isolados de amostras de urina A - *Escherichia coli* em CLED; B - *Klebsiella pneumoniae* em CLED (Fotos SPC-IPOCFG).

- Sumária de urina ou Urina tipo II

A sumária de urina consiste na avaliação semi-quantitativa de determinados parâmetros bioquímicos na amostra de urina e na visualização ao microscópio ótico do sedimento urinário. Esta realiza-se recorrendo a tiras impregnadas de reagentes específicos para avaliação de densidade relativa, pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glicose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue na urina.

A amostra é colocada num tubo, nela é mergulhada rapidamente uma tira de reagente e colocada no equipamento Cobas u411. Pela avaliação do aspeto macroscópico da amostra (cor e turvação) e através de reações químicas com base na alteração de cor nos campos correspondentes aos diferentes parâmetros bioquímicos, assim nos é dado o resultado dos parâmetros avaliados.

Após a centrifugação da urina a 1500 rpm durante 10 minutos é observado o sedimento urinário ao microscópio ótico, entre lâmina e lamela. Neste exame é observada a presença ou ausência de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros e cristais.

B. Sangue

O sangue é um produto biológico estéril, logo o isolamento de um microrganismo a partir de uma amostra de sangue é, geralmente, considerado como o agente etiológico da infecção. A invasão do sangue por microrganismos pode ocorrer por um dos seguintes mecanismos: penetração a partir de um foco primário de infecção, através dos vasos linfáticos e daí até ao sangue ou através da entrada direta dos microrganismos na corrente sanguínea por agulhas e outros dispositivos vasculares, como cateteres (47).

Para a colheita desta amostra é necessário ter um cuidado redobrado para minimizar as contaminações. Antes da colheita, o local da punção deve ser desinfetado com solução antisséptica, de modo circular, e do interior para a periferia, de modo a minimizar a probabilidade de infecção. A colheita de sangue para hemocultura deve ser efetuada em cateter venoso central, quando presente, e por venopunção, sendo que quando são realizadas hemoculturas sequenciais, devem efetuar-se em diferentes veias periféricas para aumentar a probabilidade de detetar o microrganismo presente (44). Devem inocular-se os frascos de hemoculturas com 8 – 10 ml de sangue para pesquisa de aeróbios e fungos, 5 – 7 ml para pesquisa de anaeróbios e com 1 – 5 ml para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*.

De seguida, as hemoculturas são colocadas no sistema automatizado, BD Bactec™ 9050 *Blood Culture System*. Não havendo crescimento, as amostras são dadas como negativas, após o término do tempo correspondente.

Quando há deteção de crescimento bacteriano, o sistema alerta que a hemocultura é positiva e é feito um esfregaço, corado por Gram e observado ao microscópio, e uma repicagem para Gelose COS, que é incubada a 37°C, durante 24 a 48 horas, com o objetivo final de se proceder à identificação do microrganismo em causa e à realização do seu respetivo TSA.

Microrganismos mais frequentes:

Destaca-se a prevalência de *S. aureus* e de *E. coli*, no entanto os *Staphylococcus* coagulase negativos têm aumentado a sua incidência, o que pode causar dificuldade na interpretação dos resultados, pois a grande percentagem destes isolamentos podem representar contaminação ao invés de uma bacteriemia verdadeira.

P. aeruginosa, enterobactérias, bem como *S. pneumoniae* e a *Candida albicans*, também podem ser responsáveis por bacteriemia e candidemia, respetivamente (47).

C. Secreções Respiratórias

Quando há suspeita de infecção do trato respiratório inferior, devem ser colhidas, para contentor estéril, diferentes amostras tais como expectoração, lavados ou aspirados brônquicos e outras secreções respiratórias. A amostra mais comum no SPC é a expectoração e se possível deverá ser a primeira da manhã, colhida através de tosse profunda, sendo de desprezar amostras de saliva. Devem ser colhidas três amostras em dias consecutivos, pois a emissão de alguns microrganismos não é contínua.

Depois de selecionada uma porção purulenta da amostra, esta é observada ao microscópio após coloração de Gram, sendo que devem ser observados pelo menos 10 campos, na objetiva de 10x. O objetivo é avaliar a qualidade da amostra, se é uma verdadeira expectoração, tendo em conta a relação entre a presença de células epiteliais pavimentosas (da orofaringe) e de leucócitos. Esta decisão é baseada nos critérios de Murray-Washington, indicados na tabela VII.

Segundo estes critérios, as amostras englobadas nos grupos 4 e 5, da tabela abaixo indicada, são de boa qualidade para o exame bacteriológico. Caso a amostra não se encontre nestes dois grupos, considera-se que ocorreu contaminação com secreções da orofaringe (saliva), logo esta deve ser rejeitada e recomenda-se nova colheita.

Tabela VII - Tabela de Murray e Washington (48).

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

Para além do referido, o Gram também é importante para avaliar se existe predomínio de algum microrganismo, tendo em conta a morfologia (cocos ou bacilos) e se são Gram negativo ou Gram positivo. Esta pesquisa deve ser feita com a objetiva de 50x, com óleo de imersão (48).

Paralelamente procede-se à inoculação da parte purulenta do produto pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido, em 3 meios de cultura distintos: COS, PVX e SGC2 (Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol), incubados em aerobiose, a 37°C, durante 24 horas.

Microrganismos mais frequentes: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, enterobactérias como *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Enterobacter spp.* e cocos Gram positivo, principalmente *Staphylococcus aureus* (49).

D. Exsudatos

- Exsudatos Purulentos

No SPC os exsudatos mais frequentes são os de feridas.

Nos exsudatos de lesões abertas, este deve ser colhido em zaragatoa e enviado ao laboratório em meio de transporte (Stuart ou Amies), sendo que estes meios de transporte preservam a flora bacteriana o que permite, assim, a sua cultura. Nos exsudatos de lesões fechadas deve ser evitada ao máximo a contaminação com a flora extrínseca, a colheita deve ser feita por punção e aspiração com agulha e seringa, sendo enviada a própria seringa ao laboratório (48).

Nos exsudatos purulentos, que chegam ao laboratório em zaragatoa, é feito um esfregaço corado pela técnica de Gram e inoculados os meios COS, PVX e SGC2 (Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol), incubados em aerobiose a 37°C, durante 24 horas, com o objetivo final de se proceder à identificação do microrganismo em causa e à realização do seu respetivo TSA.

Nos exsudatos em que a amostra é colhida e transportada em condições de anaerobiose esta é inoculada em meio líquido KCS (Caldo Schaedler com vitamina K3) e incubado a 37°C, durante 18 a 24 horas, em aerobiose. Também são inoculados os meios COS, PVX e SGC2 (Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol), em aerobiose, e SCS (gelose Schaedler com 5% de sangue de carneiro), em anaerobiose, incubados a 37°C, durante 24 a 48 horas. Após este tempo compara-se o crescimento bacteriano nas placas em aerobiose e em anaerobiose.

Quando o meio KCS fica turvo, provocado pelo crescimento bacteriano, procede-se à preparação de um esfregaço corado pela coloração de Gram e replica-se para COS e SCS (incubados em aerobiose e anaerobiose, respetivamente).

No SPC as atmosferas seletivas são obtidas a partir do sistema *GENbag*, que é composto por um envelope estanque de plástico flexível e transparente, que permite obter, com a utilização de um gerador, uma atmosfera adaptada à cultura das bactérias anaeróbias, microaerofilas e capnófilas (exigentes em CO₂).

Microrganismos mais frequentes: Em exsudatos de feridas, os agentes isolados com maior frequência são as Enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.* beta-hemolítico. Podemos também encontrar *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* em lesões cutâneas associadas a infeções sistémicas (48).

- Exsudatos Vaginais

A inoculação deste tipo de amostra é realizada nos mesmos meios de cultura dos restantes exsudatos de zaragatoa, no entanto compreende duas etapas muito importantes: o exame direto a fresco e a coloração de Gram.

No exame direto a fresco, para observação entre lâmina e lamela, coloca-se uma gota de NaCl (0,9%), e mistura-se um pouco da amostra para observar ao microscópio, na objetiva de 40x. Neste exame pesquisam-se elementos leveduriformes e *Trichomonas vaginalis*.

No esfregaço corado pela técnica de Gram, para além de descrever a flora bacteriana presente, deve-se procurar *Clue Cells*, células epiteliais revestidas de cocobacilos de Gram variável, características de infeção por *Gardnerella vaginalis* ou *Mobiluncus sp* (50).

E. Gânglios e produtos resultantes de Biópsias

Este tipo de amostras é colhido nas enfermarias e enviado ao SPC em contentor estéril. Quando estas amostras são de grandes dimensões são previamente maceradas, antes de serem colocadas em meio BHI, o que permite o crescimento de todos os microrganismos. Semeia-se também parte do produto macerado em COS e PVX e são incubados em condições de aerobiose, a 37°C, durante 24 a 48 horas.

Se houver crescimento bacteriano, o meio fica turvo e, então, efetua-se um esfregaço para corar por Gram e o meio é repicado para COS, de modo a que se possa proceder à identificação do microrganismo em causa e à realização do seu respetivo TSA (48).

F. Pontas de Cateter

A análise de pontas de cateter é muito importante em doentes com cateter central e com suspeita de bacteriémia comprovada ou não pelas hemoculturas. O cateter deve ser removido nestas situações e enviado ao laboratório com o objetivo final de avaliar a possibilidade de este ser o responsável pelo quadro de bacteriémia.

Devem ser colhidos, assepticamente, 5 cm da ponta do cateter, colocados num recipiente estéril e seco e enviados ao laboratório. Com uma pinça esterilizada remove-se a ponta do cateter e coloca-se na superfície de uma gelose COS, sendo que a sementeira é feita por rolamento do cateter na superfície do meio de cultura e é incubado a 37°C, durante 18 a 24 horas. Se houver desenvolvimento > 15 colónias, o microrganismo deve-se valorizar e identificar (48).

Após o rolamento da ponta do cateter, esta é colocada em meio líquido KCS (Caldo Schaedler com vitamina K3), que permite o crescimento dos microrganismos que possam existir no interior do cateter. Este meio é incubado a 37°C, durante 18 a 24 horas, em aerobiose, sendo que, se se verificar crescimento, é repicado para COS e colocado em atmosfera de CO₂.

No final da identificação dos isolamentos obtidos das culturas, a partir do rolamento da ponta do cateter e do meio líquido, é possível comparar se o microrganismo existente no interior do cateter é o mesmo que existe no exterior e deve-se correlacionar estes isolamentos com o resultado da hemocultura concomitante (48).

Microrganismos mais frequentes: Estirpes com grande probabilidade de serem agentes patogénicos, independentemente do número presente: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta-hemolítico do Grupo A de Lancefield, *Pseudomonas aeruginosa*.

Agentes possivelmente “contaminantes” da pele: (Geralmente não responsáveis por infeção, exceto nos doentes imunodeprimidos que se podem tornar oportunistas): *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus viridans*, *Bacillus* spp. (48).

G. Fezes

As infeções do trato gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, sendo que a presença de sinais clínicos e o tipo de diarreia devem orientar na pesquisa do agente etiológico.

A coprocultura consiste na pesquisa de *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Campylobacter* sp.. Se requisitado pelo clínico, e se a amostra for fezes pseudomenbranasas, pesquisa-se também a presença da toxina de *Clostridium difficile*. As amostras devem ser recolhidas em 3 dias consecutivos e enviadas ao laboratório em contentor estéril, sem refrigeração.

- Coprocultura

Na coprocultura são inoculados os meios seletivos, Hektoen e XLD, e os meios de enriquecimento, caldo Selenito e caldo GN. Sendo incubados a 37°C, os meios de cultura seletivos durante 18 a 24 horas e os meios de enriquecimento durante 12 horas.

Após 12 horas de incubação dos meios de enriquecimento, devem-se efetuar subculturas para meio de Hektoen e, eventualmente, para outros meios seletivos, como por exemplo o XLD.

A presença de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. é avaliada em paralelo, sendo que os meios Hektoen e XLD permitem o isolamento seletivo destas espécies pela observação da

fermentação da lactose, pois tanto a *Salmonella sp.* como *Shigella sp.* não são fermentadoras da lactose. Estes meios permitem ainda avaliar a formação de H₂S, uma vez que as bactérias produtoras deste gás formam colónias de centro negro. A *Salmonella sp.* é produtora de H₂S, ao contrário da *Shigella sp.*, que não é produtora de H₂S (51).

Das colónias não fermentadoras de lactose com ou sem produção de H₂S, procede-se à identificação do microrganismo e à determinação do seu respetivo TSA.

Para a pesquisa de *Campylobacter sp.* é utilizado um teste imunocromatográfico rápido, que deteta qualitativamente os antigénios de *Campylobacter*. O kit utilizado é o RIDA®Quick *Campylobacter*, em que a amostra de fezes é previamente homogeneizada com os reagentes que possuem anticorpos específicos contra *Campylobacter*. A cassette é inoculada e, após incubação, os antigénios bacterianos são detetados na zona T da cassette. Na zona C detetam-se os anticorpos presentes nos reagentes, pois funciona como banda de controlo. O teste é considerado positivo se a zona T e C apresentarem uma banda corada na leitura da cassette. É considerado negativo se apenas a zona C apresentar uma banda. No caso de não se visualizar nenhuma banda na zona C, o teste é considerado inválido, independentemente do que se verificar na zona T.

Quando o teste imunocromatográfico é positivo, é feita uma inoculação da amostra de fezes em CAM (Gelose *Campylobacter*), incubado a 37°C, durante 72 horas, em atmosfera microaerofílica.

- Pesquisa da toxina de *Clostridium difficile*

A pesquisa da enzima GDH, que é específica de *Clostridium difficile*, é feita por imunocromatografia através do Kit RIDA®Quick *Clostridium difficile*.

A amostra de fezes é previamente homogeneizada com os reagentes que possuem anticorpos específicos contra a GDH de *Clostridium difficile*. A cassette depois de inoculada deve ser lida e o seu resultado deve ser interpretado de forma idêntica à descrita para a pesquisa de *Campylobacter sp.*.

- Pesquisa da toxina B de *Clostridium difficile*

Quando o teste imunocromatográfico é positivo, deve-se confirmar a presença de *Clostridium difficile*, no GeneXpert®, por uma reação em cadeia da polimerase (PCR) automática em tempo real. São detetadas uma deleção rápida de *C. difficile tcdB* (gene de toxina B), *cdt* (gene de toxina binária) e a deleção de um nucleótido na posição 117 do gene *tcdC*. Se este teste for positivo significa que a estirpe detetada por imunocromatografia é

produtora de uma destas toxinas, por outro lado se for negativo apenas nos indica que, apesar de existir *Clostridium difficile* na nossa amostra, este não produz nenhuma das toxinas descritas.

H. Outros Fluídos Biológicos

Os principais líquidos biológicos recebidos no SPC são o líquido pleural, o peritoneal, o pericárdico, o sinovial e o Líquido Cefalorraquidiano (LCR).

Os líquidos das serosas, como o líquido pleural, peritoneal, pericárdico e sinovial, são normalmente estéreis e qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado tendo em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado. Inicialmente, a partir do líquido biológico das serosas, é feito um esfregaço corado pela técnica de Gram e semeado em COS, PVX, SGC2 (Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol) e meio líquido KCS (Caldo Schaedler com vitamina K3) que são incubados em aerobiose, a 37°C, durante 24 horas. Se a amostra for colhida e transportada em condições de anaerobiose, é semeada em meio líquido KCS (Caldo Schaedler com vitamina K3) e incubado a 37°C, durante 18 a 24 horas (52). Ambos os procedimentos com o objetivo final de se proceder à identificação do microrganismo em causa, caso esteja presente, e à realização do seu respetivo TSA.

A colheita do LCR é feita por punção lombar e o diagnóstico laboratorial deste líquido é uma urgência que requer processamento imediato do produto para determinar o seu agente etiológico. Como a colheita é invasiva, o processamento da amostra deve ser feito tendo em conta a quantidade de produto.

Inicialmente o LCR é centrifugado durante 10 minutos a 1500 rpm, sendo feito primeiramente um esfregaço do sedimento corado por Gram, em que qualquer resultado positivo deve ser comunicado imediatamente ao clínico. Para além disso, a partir do sedimento, deve ser inoculado um meio líquido BHI e, pela técnica de inundação, devem ser inoculados os meios COS e PVX que incubam a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ até às 72 horas, observando diariamente as placas. Deve ser feita a passagem do meio líquido de enriquecimento para COS e PVX às 24 e/ou 48 horas (52).

Microrganismos mais frequentes: Em recém-nascidos: *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*;

Em adultos: *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*;

Em doentes imunodeprimidos: *Cryptococcus neoformans* (52).

4.3 Exame Micológico

No SPC quando chega um produto com o pedido pelo médico requisitante de exame micológico, este é inoculado por definição no meio SGC2 (Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol), meio seletivo para a pesquisa de fungos e leveduras. Tratando-se de amostras suscetíveis de pesquisa de fungos dermatófitos, tais como raspados de pele ou unhas, processa-se a sementeira no Sistema Mycoline.

4.4 Exame Micobacteriológico

Este exame consiste na pesquisa de micobactérias, bacilos ácido álcool-resistentes (BAAR), sendo realizado em todas as amostras em que é feito o pedido pelo clínico.

Nestas amostras é preparado, a par com a inoculação das placas e o Gram, um esfregaço para ser corado pela técnica de coloração de Kinyoun.

Antes de as amostras serem processadas para exame micobacteriológico, sofrem um processo de descontaminação, liquefação, concentração e homogeneização, pois os BAAR existem em pequena quantidade nas amostras, além disso estas podem estar contaminadas com muco ou com microrganismos comensais. Para este processo é utilizado o Kit BD BBL MycoPrep.

- Descontaminação e Liquefação

O reagente principal é constituído por NaOH, N-acetil-L-cisteína e citrato de sódio. O NaOH é utilizado como descontaminante, inativando a flora comensal e como mucolítico. A N-acetil-L-cisteína é também utilizada como agente mucolítico e é utilizada para diminuir a atuação do NaOH, impedindo a sua ação sobre os BAAR. O citrato de sódio é utilizado para ligar os iões de metais pesados que possam existir na amostra e que possam inativar a N-acetil-L-cisteína. Posteriormente é adicionado o tampão fosfato, que diminui a atividade da solução N-acetil-L-cisteína - NaOH e baixa a gravidade específica da amostra, antes das micobactérias serem recuperadas por centrifugação (53).

- Concentração e Homogeneização

A amostra é centrifugada a 3000 rpm, durante 20 minutos. Caso existam BAAR na amostra ficarão concentrados no sedimento.

A partir da amostra homogeneizada, é feito um esfregaço corado pela técnica de *Kinyoun* e uma sementeira em meio de Lowenstein-Jensen, sendo este mantido com a tampa do frasco ligeiramente desenroscada para permitir a entrada de oxigénio, o qual incuba a

37°C durante 42 dias, com visualização semanal. Caso se verifique crescimento de colónias suspeitas, é efetuado um esfregaço da colónia, corado pela coloração de Kinyoun. Verificando-se que a colónia suspeita corresponde a um BAAR, o meio de cultura em causa deve ser enviado para o laboratório do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra para identificação.

4.5 Identificação de Microrganismos e Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

Quando se obtêm microrganismos isolados, a partir da sementeira dos produtos biológicos, estes devem ser identificados e determinados os TSA, de forma paralela e automática no VITEK®. No entanto, até esta identificação automática são necessários procedimentos manuais, os quais ajudam a traçar uma linha orientadora para a correta escolha da carta do microrganismo a identificar.

4.5.1 Provas de Identificação

O aspeto macroscópico das colónias, como a cor, forma, bordos da colónia, tamanho e a produção de pigmento são aspetos importantes que se podem observar nas colónias e que nos permitem fazer uma análise preliminar presuntiva. No entanto, existem microrganismos em que a sua identificação presuntiva não é possível, sendo necessária a realização de algumas provas bioquímicas e a visualização de características como o tipo de hemólise.

A. Tipos de Hemólise

Em gelose de sangue diferentes bactérias têm diferentes capacidades de lisar os glóbulos vermelhos, apresentando características diferentes nesta gelose. Na figura 5 estão representados os diferentes tipos de hemólise.

- **Microrganismos α -hemolíticos:** hemólise parcial dos glóbulos vermelhos, formando uma zona cinzenta ou esverdeada ao redor da colónia.

- **Microrganismos β -hemolíticos:** hemólise completa dos glóbulos vermelhos, formando uma zona transparente ao redor da colónia.

- **Microrganismos γ -hemolíticos:** ausência de hemólise, não se forma halo ao redor das colónias (39).

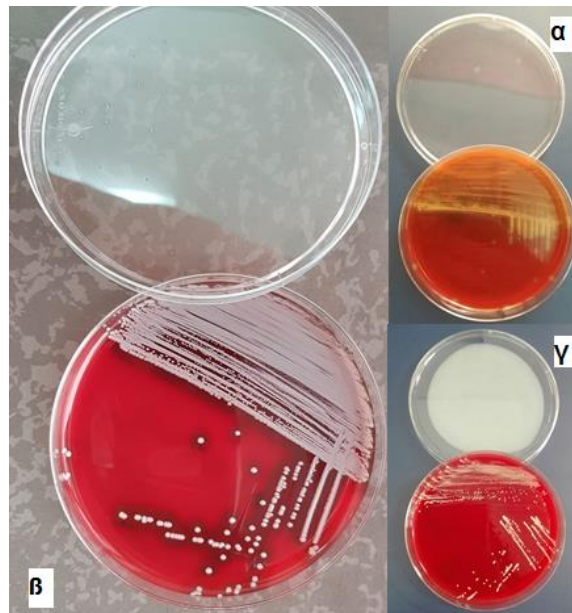


Figura 5 - Tipos de Hemólise α - Microrganismo α -hemolítico; β - Microrganismo β -hemolítico; γ - Microrganismo γ -hemolítico (Fotos SPC-IPOCFG).

B. Teste de aglutinação em látex para *Streptococcus*

O teste utilizado no SPC é o *Pastorex Strep*[®], este é constituído por testes rápidos e sensíveis de aglutinação que fornecem a identificação de *Streptococcus* β -hemolíticos pertencentes aos grupos de Lancefield A, B, C, D, F e G. Os *Streptococcus* β -hemolíticos possuem antígenos específicos na sua parede celular, sendo a sua presença demonstrada usando um reagente com partículas de látex revestidas com anticorpos homólogos, que em contacto com uma colónia do microrganismo a testar e caso se verifique a presença do antígeno específico, ocorre aglutinação e o teste é considerado positivo para o grupo em causa (54).

C. Teste da Catalase

Permite detetar a presença da enzima catalase distinguindo *Staphylococcus sp.* (catalase positiva) de *Streptococcus sp.* (catalase negativa).

Com a ponta de uma pipeta de *Pasteur* ou com um palito, transfere-se uma colónia em estudo para uma lâmina de vidro, de seguida adiciona-se uma gota de peróxido de hidrogénio. A enzima catalase decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, observando-se a formação de bolhas de ar (reação positiva) (39).

D. Teste da Coagulase

A coagulase é uma enzima termoestável produzida principalmente por estirpes de *S. aureus*.

Num tubo com 0,5 ml de plasma de coelho inocula-se uma colónia isolada da cultura em estudo e incuba-se a 37° C. Ao fim de 4 horas de incubação e sem agitar o tubo, verifica-se se existe formação de coágulo, caso se forme o coágulo a reação é positiva (39).

E. Teste da Oxidase

Este teste é utilizado para detetar a presença da enzima citocromo-oxidase, que atua como elo final na cadeia de respiração aeróbia, transferindo eletrões para o oxigénio. É utilizado para diferenciar enterobactérias (oxidase negativa) de outros bacilos Gram negativo (oxidase positiva).

Utilizam-se tiras comerciais ou um papel de filtro onde se colocam algumas gotas do reagente tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato. Com uma ansa (não metálica) retira-se uma colónia a testar e coloca-se sobre o papel. As colónias com bactérias que contenham a atividade da enzima citocromo-oxidase desenvolvem uma cor azul-roxo escura em cerca de 10 segundos (39).

F. Teste da Urease

Este teste deteta a presença de urease e é importante para diferenciar a *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*, que são urease negativa, de bactérias como o *Proteus sp.* que são urease positiva.

Inocula-se uma colónia do microrganismo a testar em meio de ureia, que incuba a 37°C, durante 18 a 24 horas. Se a urease estiver presente, degrada a ureia existente no meio com a consequente formação de amónia. O meio torna-se alcalino, havendo alteração de cor de amarelo para rosa-vermelho (39).

G. Teste de suscetibilidade à Optoquina

Este teste avalia a sensibilidade dos microrganismos à atividade da optoquina. A optoquina é uma substância que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, provocando um halo de inibição da cultura em placa (sensível) e permite distingui-lo de outras espécies de *Streptococcus* que são resistentes à optoquina.

Prepara-se uma suspensão de densidade 0,5 MacFarland a partir do microrganismo que se pretende identificar e, pela técnica de sementeira em toalha, inocula-se uma gelose de

sangue. Com uma ansa esterilizada coloca-se o disco de optoquina no centro da área inoculada e incuba-se a 37°C, durante 18 a 24 horas, em CO₂. Após a incubação, a presença de um halo sem crescimento bacteriano ≥ 19 mm ao redor do disco identifica o microrganismo como *Streptococcus pneumoniae* (39).

H. Teste de suscetibilidade à Bacitracina

Este teste avalia a sensibilidade dos microrganismos à atividade da bacitracina. É um teste de diagnóstico presuntivo para *Streptococcus* β hemolíticos, que são resistentes à bacitracina, ao invés de *Streptococcus pyogenes* que são sensíveis.

O teste executa-se de forma semelhante ao teste da optoquina, colocando-se o disco de bacitracina no centro da área inoculada e incuba a 37°C, durante 18 a 24 horas. Após a incubação, a ausência de halo de inibição é interpretada de forma presuntiva como *Streptococcus pyogenes* (39).

Com base nas características das colônias e através das provas de identificação, seleciona-se uma de 5 cartas de identificação automática disponíveis no SPC, consoante o grupo em que o microrganismo em causa se insere, como exemplificado na tabela VIII.

Para a realização da identificação, em paralelo com o TSA, é necessário preparar uma suspensão em 3 ml de solução salina com colônias do microrganismo na turvação correspondente, descrita na tabela VIII, segundo a escala de McFarland.

4.5.2 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

A seleção das cartas a usar para o TSA é feita com base nas características dos microrganismos desenvolvidos em cultura.

Deve-se também preparar uma suspensão que deve ser bem homogeneizada. Com uma pipeta de Pasteur esterilizada deve-se colocar uma gota da suspensão para ser semeada, em meio COS (para a identificação de bactérias Gram positivo), em meio CLED (para identificação de bactérias Gram negativo) ou em SGC2 (para identificação de leveduras). Este procedimento funciona como um controlo ID e tem como objetivo avaliar a pureza da suspensão utilizada na identificação do microrganismo. As cartas de identificação e TSA são então mergulhadas nas suspensões correspondentes e efetuada a sua determinação no VITEK®.

Na tabela VIII está descrita qual a carta ID que se deve utilizar para os diferentes microrganismos, bem como o respetivo TSA e a turvação padronizada que a suspensão

deverá ter. Não existem cartas de TSA para os microrganismos descritos na tabela VIII, com as cartas ANC e NH. O controlo ID destes microrganismos é efetuado a partir da suspensão preparada para a identificação, em PVX para a carta NH e em SCS para a carta ANC, incubada em anaerobiose.

Tabela VIII - Cartas de Identificação, turvação utilizada para preparação de suspensão e Cartas de TSA.

Carta ID	Turvação McFarland	Microrganismo/Característica	TSA	
GP	0.6 – 0.63	Gram Positivos	<i>Staphylococcus</i>	ATB 648
			<i>Streptococcus.</i>	ATB 586/ST 03
			<i>Enterococcus</i>	ATB 586
GN	0.6 – 0.63	Gram Negativos	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATB 355
			Oxidase positiva	ATB 354
YST	1.8 – 2.20	Leveduras	YST 08	
ANC	2.70 – 3.30	<i>Corynebacterium</i> Microrganismos anaeróbios		
NH	2.70 – 3.30	<i>Neisseria</i> <i>Haemophilus</i> Microrganismos fastidiosos		

O VITEK® indica-nos a espécie a que pertence o microrganismo, bem como se ele é sensível ou resistente aos diferentes antibióticos testados, de acordo com as normas EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

4.6 Testes de Biologia Molecular

No SPC os testes de Biologia Molecular são realizados no sistema do GeneXpert® da Cepheid. São testes qualitativos ou semi-quantitativos de diagnóstico e utilizam reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os diferentes ensaios estão descritos na tabela IX.

Tabela IX - Testes de Biologia Molecular do GeneXpert®.

Ensaio	Deteção		Amostras
Xpert C. difficile BT	Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de <i>Clostridium difficile</i>	<i>C. difficile</i> tcdB (gene de toxina B) Cdt (gene de toxina binária) Deleção de um nucleótido na posição 117 do gene tcdC	Amostras fecais não formadas (líquidas ou moles)
Xpert MTB/RIF	ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mutações do gene rpoB, associadas a resistência à rifampicina	Amostras de expetoração ou em sedimentos preparados a partir de amostras induzidas ou expetoradas, positivas ou negativas para BAAR
Xpert MRSA/SA	ADN de MRSA/ <i>Staphylococcus aureus</i>		A partir de hemoculturas positivas
Xpert MRSA NxG	ADN de MRSA		Zaragatoas nasais em pacientes com risco de colonização nasal
Xpert Carba-R Assay	Deteção e diferenciação das sequências dos genes: bla _{KPC} , bla _{NDM} , bla _{VIM} , bla _{OXA-48} , bla _{IMP-1}	Deteção dos genes associados à não suscetibilidade a carbapenemos em bactérias Gram-negativas obtidas a partir de zaragatoas	Zaragatoas retais em pacientes com risco de colonização intestinal

5. Hematologia

O setor de Hematologia está sob a coordenação da Dra. Isabel Joana Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada Especialista em Patologia Clínica. Aqui são determinados vários parâmetros hematológicos em diferentes amostras, tais como sangue total, plasma, aspirados de medula e também líquidos biológicos. São realizados hemogramas com contagem diferencial de leucócitos e contagem celular em líquidos orgânicos, velocidade de sedimentação globular, estudos da hemóstase, estudo de imunofenotipagem por citometria de fluxo, estudos genéticos por PCR em tempo real e são também executados esfregaços para coloração e observação ao microscópio.

Este setor é extremamente importante pois permite auxiliar no diagnóstico e avalia a ação da terapêutica. No SPC estes resultados são dados num espaço de tempo muito curto e é esta rapidez que permite ao clínico decidir a melhor opção a adotar relativamente ao doente, antes dos tratamentos.

6. Imunologia/Hormonologia

Este setor está sob a coordenação do Dr. Nuno Alexandre Ferreira da Cunha, Assistente de Laboratório, Licenciado em Bioquímica. A Imunologia e a Hormonologia são duas áreas distintas que se encontram fisicamente juntas e partilham diversos equipamentos e metodologias. Aqui, realiza-se o estudo e a quantificação de uma grande diversidade de parâmetros, como os marcadores tumorais, hormonas, drogas terapêuticas, proteínas de fase aguda, serologia infecciosa, entre outros.

A maioria das determinações é realizada em soro. Efetuam-se também determinações em plasma (PTH, renina, ACTH, metanefrinas plasmáticas), em sangue total (eletroforese da hemoglobina), saliva (determinação do cortisol salivar) e urina.

No SPC este setor é de enorme destaque, pois as suas determinações são um instrumento ótimo na avaliação e progressão da doença oncológica, na monitorização da eficácia dos tratamentos e como indicador de prognóstico.

7. Controlo de Qualidade

De forma a garantir a qualidade dos resultados obtidos no laboratório do IPOCFG realizam-se periodicamente dois tipos de controlo.

- Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno é efetuado todos os dias antes de se processar as amostras nos aparelhos. Na microbiologia o controlo de qualidade interno consiste no controlo de esterilidade dos meios de cultura com lote novo, no registo das temperaturas dos frigoríficos e das estufas, no controlo da solução salina e todas as semanas é feita uma reprodutividade ao Cobas u411.

Nos setores da Bioquímica Clínica, Hematologia e Imunologia/Hormonologia são usados controlos de firmas comerciais que são processados como amostras, como descrito na tabela X. Os resultados são analisados de acordo com as regras de *Westgard*. No caso de alguma destas regras ser violada, é necessário aplicar medidas corretivas, como por exemplo a calibração, e deve-se também repetir o controlo. Quando o controlo estiver de acordo com as regras de *Westgard* é aceite e pode iniciar-se o processamento das amostras.

Tabela X - Controlo de qualidade interno e nº de níveis de controlo.

Setor	Controlo	Nº de níveis de controlo
Bioquímica	Ionograma (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻)	3: Nível normal, patológico alto e muito alto
	Parâmetros Bioquímicos	2: Nível normal e patológico alto
Hematologia	Hemograma	3: nível normal, patológico alto e baixo
	Velocidade Sedimentação	3: nível normal, patológico alto e baixo
	Provas de Coagulação	3: nível normal, patológico alto e baixo
Imunologia / Hormonologia	Todos os parâmetros	2: nível normal e patológico alto

- Controlo de Qualidade Externo

O SPC participa em dois programas de controlo de qualidade externo, um programa nacional, o INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge) e um programa internacional, o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*). O INSA é realizado em todos os setores e o RIQAS realiza-se na Bioquímica Clínica, na Hematologia e na Imunologia/Hormonologia. São enviadas amostras liofilizadas para serem processadas, os resultados são enviados à entidade responsável que os analisa e envia um relatório final onde

avalia a exatidão dos resultados obtidos comparando-os com todos os laboratórios que participaram no programa. Estes programas de controlo da qualidade são muito importantes para a identificação de possíveis erros e para a implementação de medidas corretivas, quando necessárias, dando assim uma maior credibilidade aos nossos resultados.

8. Conclusão

A concretização do Mestrado de Análises Clínicas foi uma realização a nível pessoal, mas também a nível profissional, pois tenho o privilégio de trabalhar na área de que gosto e que escolhi para o meu futuro quando entrei no ensino superior.

Trabalhar no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra permitiu-me um crescimento a nível pessoal gigantesco, onde percebi o sentido da vida, que esta é demasiado efémera para perdermos tempo com coisas que não são importantes e que aquilo que realmente importa cabe numa mão. O SPC também me permitiu crescer a nível profissional e pôr em prática os conhecimentos que adquiri com a minha licenciatura. No entanto, senti necessidade de aprofundar estes saberes pois trabalho na área específica da Bioquímica Clínica e com este mestrado e com a realização do estágio em diferentes áreas de atuação permitiu-me consolidar os conhecimentos que adquiri durante estes dois anos letivos e aprofundar novos conceitos.

As análises clínicas não são uma área estática, necessitam de uma constante evolução e nós, como profissionais de saúde, temos de nos adaptar a novas técnicas e a novos métodos de análise. Têm uma importância indiscutível para a prática médica pois permitem ao clínico uma orientação no diagnóstico e na terapêutica. E neste aspeto, o SPC é irrepreensível, pois presta um serviço eficaz e de qualidade ao nível das análises clínicas. Os resultados são enviados num curto espaço de tempo, pois deles dependem decisões terapêuticas, diagnósticos e cirurgias. Existe também uma excelente comunicação entre o laboratório e o clínico, pois sempre que há alguma alteração significativa no valor das análises, bem como novas abordagens, estes são de imediato comunicados ao médico.

Por fim, este estágio foi enriquecedor no sentido de compreender melhor a complexidade do laboratório nas diferentes áreas de atuação e criou em mim um maior espírito crítico em relação ao trabalho realizado dia-a-dia nas análises clínicas. De realçar que o conhecimento e o saber permitem a qualidade dos resultados prestados pelos profissionais deste serviço.

9. Bibliografia

1. Sunheimer Robert et al. - **Analysis: Principles of Instrumentation**. In: Mcpherson, Richard; Pincus, Matthew. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 37-63.
2. D'orazio Paul; Meyerhoff Mark - **Electrochemistry and Chemical Sensors**. In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. TIEZ Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 84-101.
3. Khan Mukhtar; Weinstock Ruth - **Carbohydrates**. In: Mcpherson, Richard; Pincus, Matthew. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 210-225.
4. Portugal. Norma da Direção-Geral da Saúde - **Diagnóstico e classificação da Diabetes Mellitus**. Lisboa: DGS, 2011.
5. Portugal. Norma da Direção-Geral da Saúde - **Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c**. Lisboa: DGS, 2012.
6. Goldstein, D. E. et al. - **Tests of glycemia in diabetes**. Diabetes Care. Vol. 27, nº 7 (2004), p. 1761-73. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220264>
7. Rifai Nader; Warnick Russell; Remaley Alan - **Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors**. In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. TIEZ Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 402-430.
8. Soh James; Josekutty Joby; Hussain M. Mahmood - **Lipids and Dyslipoproteinemia**. In: Mcpherson, Richard; Pincus, Matthew. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 226-248.
9. Ng, D. S. - **Treating low HDL--from bench to bedside**. Clin Biochem. Vol. 37, nº 8 (2004), p. 649-59. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302606>
10. Linsel-Nitschke, P.; Tall, A. R. - **HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease**. Nat Rev Drug Discov. Vol. 4, nº 3 (2005), p. 193-205. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738977>
11. Lamb Edmund; Price Christopher - **Creatinine, Urea, and Uric Acid**. In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. TIEZ Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 363-372.

12. Mcpherson Richard; Pincus Matthew - **HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Philadelphia: 2011. ISBN: 978-1-4377-0974-2 p. 451-453.
13. Panteghini Mauro; Bais Renze - **Enzymes**. In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 317-336.
14. Myron, Johnson - **Amino Acids and Proteins**. In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 286-316.
15. Chatterjea Brig; Shinde Rana - **Textbook of Medical Biochemistry**. 8^a Ed. New Delhi, Panama City, London: 2012. ISBN: 978-93-5025-484-4. p. 97-99.
16. Higgins Trefor; Beutler Ernest; Doumas Basil - **Hemoglobin, Iron, and Bilirubin**. In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 509-526.
17. Vitek, L.; Ostrow, J. D. - **Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects**. Curr Pharm Des. Vol. 15, n° 25 (2009), p. 2869-83. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754364>
18. Fujiwara, R. et al. - **Systemic regulation of bilirubin homeostasis: Potential benefits of hyperbilirubinemia**. Hepatology. (2017). Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29059457>
19. Junge, W. et al. - **Development and evaluation of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37 degrees C according to the principle recommended by the IFCC**. Clin Biochem. Vol. 34, n° 8 (2001), p. 607-15. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849619>
20. Salwen Martin et al. - **Laboratory Diagnosis of Gastrointestinal and Pancreatic Disorders**. In: Mcpherson, Richard; Pincus, Matthew. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 312-328.
21. Apple Fred; Allan, Jaffe - **Cardiovascular Disease**. In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 614-630.
22. Jay, Bock - **Cardiac Injury, Atherosclerosis, and Thrombotic Disease**. In: Mcpherson, Richard; Pincus, Matthew. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by

- Laboratory Methods. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 249-258.
23. Carvajal-Zarrabal, O. et al. - **Use of Cardiac Injury Markers in the Postmortem Diagnosis of Sudden Cardiac Death.** J Forensic Sci. Vol. 62, n° 5 (2017), p. 1332-1335. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28111741>
24. Zhu, N. et al. - **Pim-I Kinase Phosphorylates Cardiac Troponin I and Regulates Cardiac Myofilament Function.** Cell Physiol Biochem. Vol. 45, n° 6 (2018), p. 2174-2186. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29544221>
25. Elghetany Tarek; Banki Katalin - **Erythrocytic Disorders.** In: Mcpherson, Richard; Pincus, Matthew. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2011, ISBN: 978-1-4377-0974-2. p. 557-559.
26. Burtis Carl et al. - **TIETZ Fundamentals of Clinical Chemistry.** 6^a Ed. St. Louis, Missouri: 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 600-601.
27. Endres David; Rude Robert - **Disorders of Bone.** In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. TIETZ Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 711-734.
28. Scott Mitchell; Legrys Vicky; Klutts Stacey - **Electrolytes and Blood Gases.** In: Burtis, Carl; Ashwood, Edward; Bruns, David; Sawyer, Barbara. TIETZ Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri: Elsevier, Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 431-449.
29. Ajantha, G. S. et al. - **Rickettsiosis: a cause of acute febrile illness and value of Weil-Felix test.** Indian J Public Health. Vol. 57, n° 3 (2013), p. 182-3. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125937>
30. Andualem, G. et al. - **A comparative study of Widal test with blood culture in the diagnosis of typhoid fever in febrile patients.** BMC Res Notes. Vol. 7, (2014), p. 653. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231649>
31. Nikolaisen, C.; Rekvig, O. P.; Nossent, H. C. - **Rheumatoid factor by laser nephelometry and Waaler-Rose assay: prognostic value in patients with recent-onset rheumatoid arthritis.** Scand J Rheumatol. Vol. 34, n° 4 (2005), p. 269-76. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16195159>
32. Spiritus, T. et al. - **Diagnostic characteristics of a gelatin based Waaler-Rose assay (Serodia-RA) for the detection of rheumatoid factor.** Ann Rheum Dis. Vol. 63, n° 9 (2004), p. 1169-71. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308531>

33. Kuhn, A.; Landmann, A. - **The classification and diagnosis of cutaneous lupus erythematosus.** J Autoimmun. Vol. 48-49, (2014), p. 14-9. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486120>
34. Bruu, A. L. et al. - **Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virus-specific and heterophile antibodies.** Clin Diagn Lab Immunol. Vol. 7, n° 3 (2000), p. 451-6. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799460>
35. Casao, M. A.; Navarro, E.; Solera, J. - **Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis.** J Infect. Vol. 49, n° 2 (2004), p. 102-8. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15236916>
36. Franken, A. A.; Oliver, J. H.; Litwin, C. M. - **Comparison of a combined nontreponemal (VDRL) and treponemal immunoblot to traditional nontreponemal and treponemal assays.** J Clin Lab Anal. Vol. 29, n° 1 (2015), p. 68-73. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390867>
37. Levy, Carlos Emílio. - **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** In: Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ª Ed.
38. Manuselis George; Mahon Connie - **Bacterial Cell Structure, Physiology, Metabolism, and Genetics.** In: Mahon Connie; Lehman Donald; Manuselis George. Textbook of Diagnostic Microbiology. Missouri: Saunders, Elsevier, 2015, ISBN: 978-0-323-08989-0. p. 2-22.
39. Fonseca, Ana Et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia.** Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004. p. 8-20.
40. Zimbro Mary Et Al. - **Culture Media and Ingredients.** In: Zimbro Mary Et Al. Manual of Microbiological Culture Media. Sparks, Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009, ISBN: 0-9727207-1-5. p. 495-502.
41. Zimbro Mary Et Al. - **Culture Media and Ingredients.** In: Zimbro Mary Et Al. Manual of Microbiological Culture Media. Sparks, Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009, ISBN: 0-9727207-1-5. p. 616-619.
42. Zimbro Mary Et Al. - **Culture Media and Ingredients.** In: Zimbro Mary Et Al. Manual of Microbiological Culture Media. Sparks, Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009, ISBN: 0-9727207-1-5. p. 120-123.

43. Zimbro Mary Et Al. - **Culture Media and Ingredients**. In: Zimbro Mary Et Al. Manual of Microbiological Culture Media. Sparks, Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009, ISBN: 0-9727207-1-5. p. 309-311.
44. Fonseca, Ana Et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004. p. 46-51.
45. Levy, Carlos Emílio. - **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. In: Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ª Ed. p. 1-8.
46. Fonseca, Ana Et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004. p. 42-45.
47. Levy, Carlos Emílio. - **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. In: Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ª Ed. p. 38-42.
48. Fonseca, Ana Et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004. p. 62-80.
49. Levy, Carlos Emílio. - **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. In: Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ª Ed. p. 53-61.
50. Fonseca, Ana Et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004. p. 85-91.
51. Fonseca, Ana Et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004. p. 81-84.
52. Fonseca, Ana Et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004. p. 52-56.

53. Tille Patricia - **Mycobacteria**. In: Tille Patricia. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017, ISBN: 978-0-323-35482-0. p. 524-554.
54. Murray Patrick; Rosenthal Ken; Pfaller Michael - **Streptococcus e Enterococcus**. In: Murray Patrick; Rosenthal Ken; Pfaller Michael. Microbiologia Médica. Elsevier, ISBN: 978-85-352-8575-8. Capítulo 19.