



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Almeida e Silva

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e pela Professora Doutora Lenka Kujovská Krčmová e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Almeida e Silva

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e pela Professora Doutora Lenka Kujovská Krčmová, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

Agradecimentos

To the Professor Dr. Lenka Kujovská Krčmová and the rest of the lab group. The words aren't enough to thank all of the help and kindness that everyone showed me in order to help me adapt to the amazing Erasmus experience, especially the friend that I can say that I gained, Dory.

Ao Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido pela compreensão e oportunidade que me deu ao me permitir completar e finalizar o estágio no seu serviço.

Ao restante grupo de trabalhadores do Serviço de Patologia Clínica que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização do presente relatório. Com especial destaque para a Dra. Maria Alexandre e Dr. Nuno Gonzaga, obrigada pela ajuda imprescindível e disponibilidade para me ensinar e orientar.

Ao Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, pela sua exigência e orientação.

Aos meus pais, por me terem dado a possibilidade de frequentar o ensino superior e por puxarem sempre por mim.

Aos meus avós, por me mostrarem do que é feita a vida e por me acompanharem sempre.

Aos meus amigos e amigas de uma vida e em especial às amigadas que fiz na Licenciatura e Mestrado. Ana, Vera, Daniela, Catarina e Joana, obrigada por todo o apoio, paciência e por nunca me deixarem desistir.

Ao Mário, por ser quem é.

Índice

Abreviaturas	9
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	12
Resumo	13
Abstract	15
Introdução	17
1ª Parte do Estágio	19
Caracterização do Laboratório de Estágio	21
Departamento de Bioquímica Clínica e Diagnóstico	21
Bioquímica Clínica	21
• Amostras	22
• Parâmetros Analisados	22
• Preparação das Amostras	24
• Equipamentos	25
2º Parte do Estágio	27
Caracterização do Laboratório de Estágio	29
Hematologia	30
Imunologia	31
Microbiologia	32
Equipamentos	32
Produtos Biológicos	33
Sangue	33
Urina	37
• Urocultura	37
• Sumária de Urina	39
Produtos Respiratórios	39
• Pesquisa de Micobactérias	41
Exsudatos	42
• Exsudato purulento superficial	42
• Exsudato purulento profundo	42
• Exsudatos Vaginais	43
Biópsias	43
Pontas de Cateter	44
Fezes	44
• Isolamento de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp.	45

• Pesquisa de <i>Campylobacter</i> sp	46
• Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i>	46
• Pesquisa da Toxina B e Toxina Binária	46
• Pesquisa de Parasitas	47
Fâneros (Pele, Cabelo e Unhas)	47
Identificação e TSA	48
• Teste da Citocromo-Oxidase	49
• Teste da Catalase	49
• Teste de Optoquina.....	49
• Teste da Bacitracina.....	49
• Teste da Novobiocina.....	50
• Cartas de Identificação e TSA.....	50
• Sistema BD BBL™ Crystal™	51
Antibiogramas Manuais.....	52
• Pesquisa de β Lactamases de Espectro Alargado (ESBLs) e Carbapenemases.....	53
Controlo de Qualidade no Setor de Microbiologia	54
• Controlo de qualidade interno	54
• Controlo de qualidade externo	54
Bioquímica Clínica	54
Amostras	54
Equipamentos	55
Princípio dos Equipamentos.....	56
• Refratometria.....	56
• Potenciometria	56
• Amperometria	56
• Espectrofotometria	56
• Turbidimetria	57
Parâmetros analisados	57
Eletrólitos.....	57
• Sódio.....	57
• Potássio.....	58
• Cloretos	58
• Cálcio	58
• Fósforo.....	59
Hidratos de Carbono.....	59
• Glicose	59
• HbA1c.....	60

Lípidos.....	60
• Colesterol Total	60
• Colesterol HDL.....	60
• Colesterol LDL.....	61
• Trigliceróis	61
Perfil Renal.....	61
• Ureia.....	61
• Creatinina.....	62
• Clearance de Creatinina.....	62
• Ácido úrico	62
Perfil hepático	62
• Bilirrubina	62
• Alanina Aminotransferase (ALT).....	63
• Aspartato aminotransferase (AST).....	63
• Fosfatase Alcalina (ALP).....	63
• γ – glutamiltransferase (γ GT).....	63
• LDH	63
• Albumina.....	63
Perfil pancreático.....	64
• Amílase.....	64
• Lipase.....	64
Metabolismo do ferro	65
Proteínas Totais.....	65
Marcadores de lesão cardíaca	66
• Mioglobina.....	66
• CK-MB	66
• Troponinas.....	66
Gasometria	67
• pH.....	67
• pO_2	68
• pCO_2	68
Controlo de Qualidade em Bioquímica Clínica.....	69
• Controlo de Qualidade Externo	69
• Controlo de Qualidade Interno	69
Conclusão.....	71
Bibliografia.....	73

Abreviaturas

1,25(OH)₂D - 1,25-di-hidroxivitamina D

25(OH)D - 25-hidroxivitamina D

ALP - Fosfatase Alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

BAAR - Bacilos Ácido-Álcool-Resistentes

BHI - Brain Heart Infusion

Ca₂⁺ - Cálcio

CAT- Teste de atividade de carbapenemases (do inglês, Carbapenemase activity test)

CEA - Antígeno Carcinoembrionário

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CKMB - Creatina cinase MB

CLED - Cistina- Lactose - Deficiente de Eletrólitos

CNA - Gelose Columbia com sangue, colistina e ácido nalidíxico

CO₂ - Dióxido de Carbono

COS - Gelose Columbia suplementada com 5% de sangue de carneiro

DGS - Direção Geral de Saúde

EAM - Enfarte agudo do miocárdio

ESBLs - β Lactamases de Espectro Alargado (do inglês *Extended Spectrum β Lactamases*)

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Fator X - Heme

GN - Caldo de Gram negativo

H₂S - Sulfureto de Hidrogênio

HbA_{1c} - Hemoglobina Glicada

HCO₃⁻ - Bicarbonato

HDL - Lipoproteínas de Alta Densidade (do inglês, *High Density Lipoproteins*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

ID - Identificação

IDO - Indoleamina 2,3 dioxigenase

IFN-gama - Interferência gama

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IPO - Instituto Português de Oncologia
IPOCFG - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil
K3EDTA - Tripotássico ácido etilenodiamino tetra-acético
KCS - Schaedler líquido
KOH - Hidróxido de Potássio
KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LCR - Líquido Cefalorraquidiano
LDH - Lactato Desidrogenase
LDL - Lipoproteínas de Baixa Densidade (do inglês, Low Density Lipoproteins)
LJ - Löwenstein Jensen
LMC - Leucemia Mieloide Crónica
MHE - Gelose Mueller-Hinton
MHF - Gelose Mueller-Hinton + 5% Sangue de cavalo + 20mg/l β -NAD
N₂ - Azoto
NaCl - Cloreto de Sódio
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaOH - Hidróxido de Sódio
O₂ - Oxigénio
pCO₂ - Pressão parcial do CO₂
PCR - Reação de Polimerase em Cadeia (do inglês *polymerase chain reaction*)
pO₂ - Pressão parcial do O₂
PVX - Gelose de chocolate suplementada com Polivitex X
SCS - Gelose de Shaedler sólido com 5% de carneiro
SGC2 - Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol
SPC - Serviço de Patologia Clínica
TFG - Taxa de Filtração Glomerular
TSA - Teste de suscetibilidade a antimicrobianos
TSDT - Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica
VLDL - Lipoproteínas com Densidade Muito Baixa (do inglês, Very Low Density Lipoproteins)
XLD - Desoxicolato-lisina-xilose

Lista de Figuras

Figura 1 - Técnica de Coloração de Gram [Adaptada de Microbiologia Médica, Murray (7ed)].

Figura 2 - Comparação entre as estruturas das paredes celulares de bactérias Gram-positivo (A) e Gram-negativo (B) [Adaptada de Microbiologia Médica, Murray (7th ed)].

Figura 3 - Diferentes formas morfológicas das bactérias [Adaptada de Microbiologia Médica, Murray (7ed)].

Figura 4 - Técnica de Sementeira Quantitativa de urinas: A para E.

Figura 5 - Fotos de microrganismos isolados de amostras de urina do SPC. A- *Klebsiella pneumoniae*; B- *Echerichia coli*, em ambas se observam colónias amarelas, fermentadoras da lactose.

Figura 6 - Aspeto de uma amostra contaminada com secreções da orofaringe onde se podem observar muitas células epiteliais.

Figura 7 - Cassete para teste imunocromatográfico de RIDA QUICK *Campylobacter*. Fonte: <https://clinical.r-biopharm.com/>

Figura 8 - Exemplo de β -hemólise produzido por *Staphylococcus aureus*.

Figura 9 - A) Sistema BD BBL™ Crystal™ Gram Positivo. B) Carta de leitura do sistema BD BBL™ Crystal™ Gram Positivo.

Figura 10 - Pesquisa de ESBLs e Carbapenemases pela técnica de Kirby Bauer em gelose MHE.

Figura 11 - Níveis séricos da amílase e da lípase depois da pancreatite aguda. Adaptado Tietz: fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular.

Figura 12 - A: Libertação precoce de Mioglobina e isoformas de CK-MB após EAM; B: troponina I após EAM; C: CK-MB após EAM; D: Troponinas após Angina Instável (Adaptado de HENRIQUES, Sílvia *et al.* - Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas. Sociedade Portuguesa de Medicina Interna).

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Equipamentos do Setor de Hematologia.

Tabela 2 - Principais equipamentos do Setor de Microbiologia.

Tabela 3 - Descrição da Técnica de Coloração de Kinyoun.

Tabela 4 - Critérios de Murray-Washington: Avaliação da qualidade das amostras de expectoração com coloração de Gram.

Tabela 5 - Diferentes tipos de cartas de ID e respectivos valores de densidade adequados para suspensão dos microrganismos.

Tabela 6 - Equipamentos do Setor de Bioquímica Clínica.

Resumo

O estágio curricular do Mestrado de Análises Clínicas decorreu de janeiro de 2019 a junho de 2019, tendo sido dividido em duas partes. A primeira parte realizou-se no Departamento de Bioquímica Clínica e Diagnóstico do Hospital Universitário de Hradec Kralové, na República Checa, no âmbito da mobilidade Erasmus +, sob a orientação da Professora Doutora Lenka Kujovská Krčmová, tendo consistido essencialmente na preparação de amostras biológicas para posterior medição, monitorização e avaliação de parâmetros bioquímicos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), reconhecidos como biomarcadores de diagnóstico de diversas patologias. A segunda parte decorreu no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG), onde me foi permitido adquirir conhecimentos e experiência da rotina das análises clínicas em 3 setores diferentes (Bioquímica Clínica, Microbiologia e Hematologia). Embora tenha sido possível adquirir algumas noções de Imunologia e Hematologia ao longo do estágio, este relatório ir-se-á focar especificamente nas áreas de Microbiologia e Bioquímica Clínica.

Em suma, pretende-se com o presente relatório descrever brevemente o trabalho desenvolvido em Bioquímica Clínica no Hospital Universitário de Hradec Kralové e, posteriormente, aprofundar as atividades realizadas em Microbiologia e Bioquímica Clínica no Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPO).

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

Abstract

The curricular internship of the Master degree in Clinical Analysis took place from January 2019 to June 2019 and was divided into two parts. The first part took place at the Department of Clinical Biochemistry and Diagnosis of the Hradec Kralové University Hospital in Czech Republic, through the program Erasmus +, under the guidance of Professor Lenka Kujovská Krčmová. It consisted in preparing biological samples for later assessment, monitoring and evaluation of biochemical parameters by HPLC, known as diagnostic biomarkers of various pathologies. The second part took place at the Clinical Pathology Service of the Portuguese Institute of Oncology in Coimbra where it was possible to gain knowledge and experience of the routine performed in the clinical analysis area in 3 different sectors (Clinical Biochemistry, Clinical Microbiology and Hematology). Although some notions of Immunology and Hematology were acquired throughout the internship, this report will focus specifically on the areas of Clinical Microbiology and Clinical Biochemistry. In summary, the purpose of this report is to briefly describe the work carried out in Clinical Biochemistry at Hradec Kralové University Hospital and, subsequently, to deepen the activities carried out in Clinical Microbiology and Clinical Biochemistry at the Oncology Hospital.

Keywords: Clinical Analysis, Clinical Biochemistry, Microbiology, Biomarkers, Biochemical Parameters, Microorganisms.

Introdução

As análises clínicas são o ramo da saúde que trabalham com o estudo de substâncias biológicas ou não biológicas de forma a recolher informação e determinar diagnósticos a respeito do estado clínico dos doentes. Cada vez mais as análises clínicas e a sua interpretação manifestam grande importância no sucesso da prática clínica uma vez que leituras erradas impossibilitam o alcance de um diagnóstico rápido e preciso. Trate-se de situações ambulatoriais, de doenças mais graves, como é o caso de doenças do foro oncológico, ou de investigação, é necessária uma abordagem multidisciplinar. Para que tal seja possível, o trabalho no âmbito das análises clínicas conta com a presença de diversos colaboradores de diferentes áreas de forma a que a heterogeneidade dos diferentes processos do organismo seja abrangida e corretamente interpretada. O meu estágio curricular desenvolveu-se em duas áreas e períodos distintos e por sua vez, o presente relatório encontra-se dividido em duas partes. A 1ª parte conta com uma breve abordagem dos trabalhos de investigação desenvolvidos no Departamento de Bioquímica Clínica e Diagnóstico do hospital de Hradec Kralové na República Checa nos quais tive a oportunidade de participar. A 2ª parte é referente ao período de estágio no SPC do IPO, em que uma vez mais, a abordagem multidisciplinar se reveste de especial importância no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento da doença oncológica, não só pela sua complexidade e diversidade de especialidades envolvidas, como também pela necessidade permanente de monitorização deste tipo de doentes e atualização da terapêutica respetiva.

I^a Parte do Estágio

Caracterização do Laboratório de Estágio

Departamento de Bioquímica Clínica e Diagnóstico

O Departamento de Bioquímica Clínica e Diagnóstico, anteriormente denominado de Departamento de Cuidados Metabólicos e Gerontologia, faz parte do Hospital Universitário de Hradec Králové. Sendo este um dos hospitais mais conhecidos da República Checa, é famoso pelas ótimas condições que oferece e pelo excelente trabalho desenvolvido na área da investigação.

O departamento colabora com os restantes departamentos do hospital, designadamente de Cirurgia, Nefrologia e Oncologia, assim como com o Departamento de Química Analítica da Faculdade de Farmácia. Contudo, é do departamento de Oncologia e da Clínica de Gerontologia que recebem a maioria das amostras. Situado no edifício nº22, no 5ª andar, tem como principais funções o diagnóstico e tratamento de pacientes com distúrbios do metabolismo e nutrição, como por exemplo a *Diabetes Mellitus*, insuficiência renal ou hepática e obesidade, apoio a pacientes com necessidade de nutrição parenteral e enteral, diagnóstico especial e tratamento de outro tipo de distúrbios do metabolismo (distúrbios do metabolismo lipídico), diagnóstico e tratamento de doenças agudas em utentes idosos e diagnóstico e tratamento de doenças associadas ao envelhecimento geral e precoce.

O envelhecimento é um dos principais objetos de estudo deste departamento uma vez que está associado a inúmeros problemas debilitantes/degenerativos e do foro oncológico. Assim sendo, há diversos projetos e profissionais no departamento que se focam na procura de um diagnóstico precoce com recurso a diferentes tipos de biomarcadores, tendo como principal objetivo obter prognósticos promissores para os utentes. Para tal, é estudada a presença/ausência destes biomarcadores em diversas patologias e são desenvolvidos novos métodos de análise com recurso ao HPLC, a ferramenta mais utilizada neste departamento.

Bioquímica Clínica

A Bioquímica Clínica é uma área multidisciplinar que faz a ligação entre a Química e a Patologia. Tem como função a avaliação de diversos parâmetros bioquímicos, sendo que o seu uso permite o diagnóstico, tratamento, monitorização e possível prevenção de doenças. Desta forma, a investigação dos diversos analitos pode ser usada na Medicina Hospitalar como suporte médico para confirmar ou descartar determinados diagnósticos. Através da prática laboratorial da Bioquímica Clínica é possível executar técnicas, identificar e obter produtos

biológicos necessários à determinação de cada parâmetro, o que nos permite ter uma percepção mais próxima dos erros comuns analíticos e não analíticos.

- **Amostras**

O departamento recebe amostras de fluido amniótico, ascites, exsudatos, urina, soro, plasma e sangue humano de acordo com os projetos em execução. Contudo, o soro tende a ser a amostra mais comum. As mesmas têm de incluir a data da recolha no tubo de colheita e serem cobertas por papel de alumínio de forma a evitar a degradação pela luz. Caso sejam amostras de longo termo, são depois armazenadas num congelador a -85°C .

- **Parâmetros Analisados**

O papel da resposta imunitária como um fator crucial na determinação do resultado de doenças malignas, doenças progressivas e no desenvolvimento de eventos adversos é cada vez mais reconhecido. Assim, de forma a atingir bons prognósticos ligados ao envelhecimento, os parâmetros analisados têm-se centrado essencialmente na resposta inflamatória, nos processos oxidativos e no efeito de fármacos, com recurso à análise de vitaminas, marcadores de ativação da resposta imunitária e do metabolismo lipídico.

As vitaminas são compostos orgânicos indispensáveis ao crescimento e à manutenção da vida cujo organismo não tem capacidade de sintetizar. São ativas em quantidades muito pequenas e estão envolvidas em vários processos relacionados com a transferência e armazenamento de energia, proteção e reforço do nosso sistema imunitário (defesas do organismo), formação de ossos e tecidos, atividade de outros nutrientes, formação e manutenção da estrutura e funções celulares, etc. Estas classificam-se como lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (8 vitaminas do complexo B e a C).

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel que tem um papel particularmente importante nos processos oxidativos e na resposta imunitária. Nos humanos existem 3 formas ativas: o Retinol, o Retinal e Ácido Retinóico. Uma vez que não pode ser sintetizada pelo organismo, tem de ser obtida pela dieta. Pode ser encontrada nos alimentos sob duas formas: a vitamina A pré formada ou retinol (de origem animal) presente no fígado, carnes de outros órgãos, óleos de peixe, leite, manteiga e margarinas, e a pró vitamina A ou carotenoides (de origem vegetal) responsáveis pela cor laranja ou amarela das frutas e vegetais (Burtis *et al.*, 2016). É essencial para a saúde da visão, uma vez que faz parte da constituição do pigmento sensível à luz presente nos bastonetes (células visuais), chamado rodopsina. Contribui para a manutenção da pele e mucosas saudáveis e regula o crescimento e divisão das células com a

sua participação no processo de diferenciação celular (Sidrys e Partamian, 1979). Consequentemente, a deficiência na obtenção de Vitamina A leva a uma série de problemas, tais como secura das membranas mucosas, dos olhos e da pele, atraso no crescimento e desenvolvimento, cegueira noturna e sintomas comumente usados no diagnóstico de déficit de vitamina A (Nelson, Cox e Lehninger, 2013).

A vitamina E foi uma das primeiras vitaminas a ser descobertas e é um antioxidante essencial solúvel em lípidos. Divide-se em dois grupos, tocoferóis e tocotrienóis, sendo que em ambos existem quatro isoformas (alfa, beta, gama e delta). De todas, o alfa-tocoferol é a mais comum e mais ativa. A sua principal função, sendo um dos antioxidantes mais importantes a proteger o ambiente lipídico do dano oxidativo é prevenir a peroxidação lipídica. A deficiência em humanos é rara. Os sintomas do decréscimo desta vitamina variam consoante a sua causa levando a quadros clínicos diferentes. Uma absorção reduzida desta vitamina pela dieta aumenta particularmente o stress oxidativo nos eritrócitos, fragilizando-os, o que mais tarde irá levar ao aparecimento de anemia hemolítica. Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre o déficit de vitamina E e a incidência de doenças crónicas como é o caso de doenças do foro neurológico, oncológico e cardiovascular, embora a maioria dos estudos sobre suplementação não tenham demonstrado qualquer benefício (Burtis *et al.*, 2016).

A vitamina D ao contrário das outras vitaminas funciona como uma hormona, é sintetizada na pele através da exposição à luz ultravioleta e é absorvida a partir dos alimentos. Apresenta-se sob duas formas, vitamina D₂ ou ergocalciferol e vitamina D₃ ou colecalciferol em plantas e animais respetivamente. Ambas estão inativas nos humanos e têm de passar por uma série de processos metabólicos antes de atingirem os tecidos alvos. A forma biologicamente mais ativa de vitamina D é a 1,25-di-hidroxitamina D (1,25(OH)₂D), enquanto que 25-hidroxitamina D (25(OH)D) é a principal forma circulante da mesma. Desempenha um papel importante no metabolismo do cálcio e a sua deficiência causa sérias deformações ósseas (Burtis *et al.*, 2016).

Como marcadores da ativação da resposta imunitária são medidos a neoptirina, triptofano, creatinina e quinurenina. A neoptirina é um produto do stress oxidativo e da inflamação produzida pelos macrófagos que levou ao seu estudo em muitos campos de pesquisa. Um aumento nos níveis de neoptirina, provocado pelo estímulo do interferão-gama (IFN-gama), foi reportado em diversas patologias relacionadas com a imunidade celular incluindo infeções virais, cancro, doenças autoimunes e rejeição de órgãos após transplante. Já a quinurenina resulta da catalisação do Triptofano pela indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) também induzida

pelo IFN-gama. A indução da atividade da IDO leva à depleção do triptofano sendo então um dos mecanismos responsáveis pela supressão da resposta imunitária aumentando a inflamação e progressão da doença (Baxter-Parker *et al.*, 2019).

- **Preparação das Amostras**

De forma a se proceder devidamente às análises destes parâmetros, as amostras oriundas dos diferentes hospitais ou departamentos dentro do hospital, com o qual existem acordos e parcerias, têm de ser preparadas de modo a que a análise ocorra sem interferências. Para este fim, e novamente, de acordo com os respetivos projetos, os procedimentos consistem essencialmente na Filtração, Precipitação de Proteínas, Centrifugação e Extração Líquido-Líquido.

A filtração é uma técnica muito simples que tem como objetivo melhorar a qualidade da amostra ao remover as partículas que podem interferir com os métodos analíticos. As partículas que não forem filtradas podem entupir os instrumentos e colunas que fazem parte da constituição do HPLC, criando bloqueios ou pressões altas no aparelho. No melhor dos cenários este tipo de problemas irá reduzir o tempo de vida útil das colunas ou até os instrumentos em si. Apesar de ser uma técnica bastante simples e acessível, a filtração tem pouca capacidade de purificação da amostra do ponto de vista químico. Deste modo a filtração só por si não é suficiente para fornecer a qualidade que a amostra necessita para ser submetida ao processo analítico.

A precipitação de proteínas é uma técnica rápida usualmente utilizada na limpeza de amostras brutas. Para dar início à precipitação é necessário mudar a solubilidade das proteínas, uma vez que a maioria só apresenta solubilidade numa gama limitada de solventes. Se o solvente for alterado de forma apropriada, as proteínas irão precipitar e poderão ser removidas da amostra por filtração ou centrifugação. Posto isto, a precipitação pode ser atingida através da adição de um solvente orgânico, solventes inorgânicos, surfactantes não iónicos ou certos metais. Contudo, e embora seja um processo extremamente eficaz, a precipitação de proteínas não tem em conta a presença de outros contaminantes das amostras que podem trazer problemas analíticos, como é o caso dos lípidos.

A centrifugação é uma técnica que permite a remoção de partículas das amostras antes que estas sejam processadas. Assim como a filtração, a centrifugação não é capaz, do ponto de vista químico, purificar a amostra, tornando-se insuficiente como técnica de preparação.

Contudo aliada a outras técnicas, esta permite uma separação fácil das proteínas precipitadas nas amostras.

A extração líquido-líquido é uma abordagem para preparação de amostras que se baseia na solubilidade diferencial dos vários componentes de uma amostra. É executada através da adição de um solvente que é imiscível com o solvente da amostra original criando duas camadas distintas após a agitação por vórtice. Caso os analitos alvo da amostra exibam uma maior solubilidade no solvente de extração do que no solvente da amostra, estes passarão para o solvente de extração. O processo de extração culmina com o solvente de extração contendo os analitos alvo mais isolados e purificados do que inicialmente na amostra original.

- **Equipamentos**

Uma vez feita a devida preparação das amostras, estas seguem para a análise através da HPLC. A cromatografia é a técnica mais usada na separação de misturas de substâncias. A separação é baseada na estrutura e composição molecular dos constituintes da amostra e envolve a fase móvel (líquido ou gás) e a fase estacionária (sólido ou um líquido suportado num sólido). A fase móvel flui através da fase estacionária e transporta com ela os componentes da mistura. Estes últimos, que exibem interações mais fortes com a fase estacionária, vão-se mover mais lentamente através da coluna do que os componentes com interações mais fracas. Esta diferença na velocidade causa a separação de vários componentes. Essencialmente a HPLC é então uma técnica de cromatografia melhorada em que o solvente em vez de percorrer a coluna sob o efeito da gravidade, é forçado através desta sob altas pressões, o que torna todo o processo muito mais rápido e aumenta a resolução. Embora a inserção das amostras, configuração, escolha dos elementos do equipamento e monitorização do processo analítico no HPLC seja apenas realizado por alunos de doutoramento e respetivos orientadores, foi-me permitido observar partes do processo e alguns dos resultados em cromatogramas.

2º Parte do Estágio

Caracterização do Laboratório de Estágio

A história do IPOCFG remonta a 29 de dezembro de 1927 quando o Prof Doutor Francisco Gentil concretiza um dos seus maiores sonhos ao inaugurar o primeiro pavilhão do IPO, o primeiro Centro Regional da luta contra o cancro em Portugal. É então que em Coimbra, 3 décadas depois, em 1953, o Prof. Doutor Luís Raposo adquire uma pequena vivenda, que veio a ser o primeiro edifício da sede do Centro de Coimbra do IPO para dar resposta a toda a população do centro do país. Nos dias de hoje o IPO é uma unidade hospitalar que abrange toda a região centro prestando cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde na área da Oncologia a cerca de 2 milhões de habitantes (IPO Coimbra, 2019).

O SPC do IPO de Coimbra localiza-se no edifício da Oncologia Médica e Laboratórios no piso 0. Tem como Diretor o Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido especialista em Patologia Clínica pela ordem dos médicos e possui 4 setores distintos de Análises Clínicas: a Hematologia, coordenada pela Dra. Joana Diamantino (Assistente graduada especialista em Patologia Clínica), a Imunologia coordenada pelo Dr. Nuno Cunha (Técnico Superior de Saúde especialista em Análises Clínicas), a Bioquímica coordenada pelo Dr. Luís Nina (Assistente graduado especialista em Patologia Clínica) e a Microbiologia coordenada pela Dra. Maria Alexandre (Farmacêutica especialista em Análises Clínicas e Genética). Fazem também parte deste serviço outros médicos e médicos internos da especialidade, técnicos superiores de saúde, técnicos de diagnóstico e terapêutica, administrativos e auxiliares que contribuem para o fluxo de trabalho diário dos diferentes setores.

Em conjunto com os doentes hospitalizados, são recebidos diariamente na secretaria inúmeros utentes para a realização de diversas análises, que no total perfazem 350 amostras diárias.

Os médicos da instituição solicitam a realização de análises em requisição própria para os respetivos setores onde identificam o doente, data de colheita e o tipo produto à qual é atribuído um código de barras equivalente à identificação do pedido.

As colheitas são realizadas por técnicas/os de acordo com os exames requeridos pelo clínico responsável, sendo que as mesmas são posteriormente distribuídas por tubos respetivos a cada setor e entregues a estes juntamente com as requisições por auxiliares. As amostras dão entrada nos setores no sistema informático Modulab (Werfen) através da leitura do código de barras de cada tubo e são depois processadas nos equipamentos respetivos de acordo com o fluxo de trabalho estabelecido.

Hematologia

O primeiro setor no qual eu tive a oportunidade de estagiar e desenvolver aptidões da rotina do laboratório de Análises Clínicas foi no setor de Hematologia. As amostras de sangue total vindas da sala de colheitas em tubos com anticoagulante tripotássico ácido etilenodiamino tetra-acético (K3EDTA) são utilizadas para a realização dos hemogramas, velocidade de sedimentação e observação de esfregaços sanguíneos. Para a observação destes e dos aspirados de medula óssea também recebidos pelo setor é feita a coloração automatizada de Wright-Giemsa modificada. Os hemogramas são repetidos sempre que os Basófilos são $> 2\%$, quando há alertas de blastos, plaquetas gigantes ou agregados plaquetares, interferências celulares, quando a hemoglobina é < 7 , quando a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é > 36 ou quando há alterações nas diferentes linhas celulares dos glóbulos brancos. Em paralelo recebem também tubos de sangue total para provas de coagulação com uma quantidade significativa de anticoagulante de Citrato de Sódio tendo uma proporção amostra-anticoagulante de 9:1 que dilui a amostra. O sangue deve ser colocado no tubo apenas até à linha designada do mesmo, de modo a que não haja interferências na medição do equipamento. Os tubos são centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos e só posteriormente se procede às provas de hemostase. Entre algumas das provas mais comuns encontram-se o Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada, Tempo de Trombina e Quantificação de Fibrinogénio. É de ressaltar que, nas colheitas em que o sangue demora a ser colhido, quando este é misturado com o Citrato de Sódio, a cascata da coagulação pode já ter sido iniciada anteriormente antes de ser interrompida pelo anticoagulante. Quando o tubo é inserido no equipamento e este adiciona o cálcio (Ca^{2+}), a cascata reinicia-se a meio, o que pode interferir com os tempos das provas pedidas, encurtando-os. Ainda que tempos curtos não apresentem significado clínico é um embaraço no processo analítico. Outra interferência na análise dos parâmetros ocorre quando as amostras se apresentam hemolisadas, uma vez que o equipamento funciona por leitura ótica. Embora não tenha tido a oportunidade de adquirir conhecimentos sobre a Citometria de Fluxo, o setor faz uso deste equipamento no que toca à imunofenotipagem das linhas celulares de interesse. É também tirado partido dos avanços da Biologia Molecular, nomeadamente o uso da reação de polimerase em cadeia (PCR) para fazer a pesquisa do gene BCR ABL na monitorização de doentes com Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Na Tabela I encontram-se os equipamentos utilizados na análise dos diferentes parâmetros referidos anteriormente.

Tabela I: Equipamentos do Setor de Hematologia

Equipamentos	Funcionalidades
- Coulter® LH 750 Analyzer (Beckman)	Hemogramas
- Test I Bcl da Alifax® SPA	Velocidade de Sedimentação
-Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Centrifuge	Colorações
- ACL TOP® CTS 500	Provas de Coagulação
-Beckman Coulter® Cytomics™ FC 500 e Beckman Coulter® TQ Prep	Citometria de Fluxo
- GeneXpert® Cepheid	PCR em tempo real

Imunologia

Imunologia foi o setor no qual, infelizmente não tive oportunidade de desenvolver capacidades e ritmo de trabalho; contudo, foi-me dada a oportunidade de acompanhar dois dos técnicos superiores durante dois dias ao longo da sua rotina, de forma a compreender que parâmetros aqui são pesquisados. Embora num reduzido período de tempo, foi possível ter a percepção de que a Imunologia, devido ao foro hospitalar em que se enquadra, é um dos setores que mais amostras recebe. Isto porque, a grande maioria das análises aqui realizadas consistem na pesquisa de proteínas e hormonas que funcionam como marcadores tumorais em diversas patologias oncológicas. Como exemplos mais comuns deste tipo de proteínas e hormonas pesquisadas temos por exemplo, o Antígeno Carcinoembrionário (CEA), a Calcitonina e a Tiroglobulina. O principal objetivo para o futuro será o de encontrar um marcador o mais sensível e específico possível de uma determinada patologia, visto que os que existem hoje, embora ajudem na monitorização dos tumores, ainda possuem tanto falsos positivos como falsos negativos, reduzindo a sensibilidade e especificidade do marcador. O setor trabalha essencialmente com soro de modo que é necessário centrifugar o sangue total que chega nos tubos com esferas ativadoras da coagulação, a 3000 rpm durante 10 min. Em adição à análise automatizada dos parâmetros, foi possível observar algumas das técnicas manuais realizadas, com destaque para a deteção do iodo na urina e pesquisa de metanefrinas e normetanefrinas por ensaios competitivos e proteinograma por eletroforese em gel de agarose.

Microbiologia

A Microbiologia como o nome indica, é o estudo dos seres vivos mais pequenos. Ao longo dos anos, com o avanço da tecnologia e conhecimentos, a Microbiologia é uma área que tem vindo a ganhar cada vez mais interesse no que diz respeito a questões de Saúde Pública, uma vez que incide sobre o estudo dos agentes patogénicos responsáveis pelas epidemias que mais predominam nas sociedades atuais em todo o globo. A Microbiologia clínica do SPC tem como principal objetivo a identificação dos agentes patogénicos associados às infeções em doentes oncológicos, que na sua maioria são oportunistas, dado o estado debilitado e imunocomprometido dos mesmos. As amostras dos diferentes produtos devem ser colhidas de forma correta, de modo a que as condições de sobrevivência necessárias aos microrganismos se mantenham desde o momento em que se inicia a colheita, passando pelo transporte e armazenamento das amostras até ao seu processamento. O sucesso desta cadeia de trabalho e posterior correta identificação do(s) microrganismo(s) só é possível se todos os intervenientes respeitarem o *modus operandi* das colheitas específicas de cada produto, o que por vezes não acontece, levando muitas das vezes ao não desenvolvimento dos microrganismos e sua posterior identificação. No setor da Microbiologia tive a oportunidade de processar vários produtos, destacando as hemoculturas e urinas, uma vez que são as amostras mais comuns, englobando o seu processamento, identificação do(s) microrganismo(s) e os respetivos testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA). Desta forma, é possível informar o clínico não só da etiologia da infeção existente no doente, como também orientar a terapêutica de modo a que seja o mais específica possível.

Equipamentos

Na Tabela 2 estão representados os principais equipamentos utilizados pelo setor da Microbiologia clínica e as suas respetivas funções.

Tabela 2: Principais equipamentos do Setor de Microbiologia

Equipamentos	Funcionalidades
BD Bactec™ 9050 Blood Culture System	Hemoculturas
Vitek® 2 Compact 15 (BioMérieux)	Cartas de Identificação (ID) e TSA
Cobas® u411 (Roche Diagnostics)	Sumárias de Urina
Estufas de 25°C, 30°C, 37°C e 42°C	Crescimento de fungos e bactérias
GeneXpert® (Cepheid)	PCR em tempo real

Produtos Biológicos

Sangue

O sangue é um produto biológico estéril, logo, quando ocorre isolamento de microrganismos neste produto é geralmente um agente etiológico de infecção (Fonseca *et al.*, 2004). A colheita para as hemoculturas é feita por punção venosa das veias periféricas ou cateteres pelos Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) após a desinfecção da pele, de modo a evitar a contaminação pela microbiota comensal da mesma (Madigan *et al.*, 2012). De seguida, procede-se à inoculação das garrafas de hemocultura sendo cada uma identificada com código de barras correspondente ao doente. Estas garrafas possuem resinas quelantes de antibióticos, de forma a que, ainda que tenha sido previamente administrado algum fármaco ao doente, e este se encontre em circulação, não afete o crescimento dos microrganismos. A utilização de diferentes garrafas e tempos de incubação, depende do microrganismo suspeito. Caso se pretenda pesquisar a existência de microrganismos aeróbios e anaeróbios ou fungos, utilizam-se garrafas diferentes, que são inoculadas com volumes entre 8 a 10 ml de sangue durante 7 e 14 dias respetivamente. Por outro lado, caso estejamos perante a suspeita de micobactérias, os volumes da inoculação das respetivas garrafas variam entre 1 a 5 ml e são incubadas durante 42 dias. Estes volumes não devem ser ultrapassados, nem por excesso nem por defeito, pois caso contrário os resultados poderão corresponder a falsos positivos ou falsos negativos. O equipamento BD BACTEC™ 9050 Blood Culture System onde as garrafas de hemocultura são incubadas, mantém um ambiente de 35°C, agitação, e deteta a fluorescência emitida pela alteração do pH do meio, devido à produção de dióxido de carbono (CO₂) por parte dos microrganismos, a cada 10 minutos (Dickinson, 2019a). Caso as hemoculturas sejam positivas, o equipamento dá um sinal luminoso e sonoro e estas são retiradas para processamento posterior que inclui a realização de um esfregaço sanguíneo para coloração de Gram e inoculação em meio de cultura apropriado. A repicagem da hemocultura é feita com recurso a agulha e seringa esterilizadas após esterilização da zona a picar pelo calor.

A técnica de coloração de Gram (Fig. 1) permite diferenciar os microrganismos consoante a sua capacidade de retenção dos corantes em dois grandes grupos, os Gram-positivo e os Gram-negativo, que coram de roxo e rosa, respetivamente.

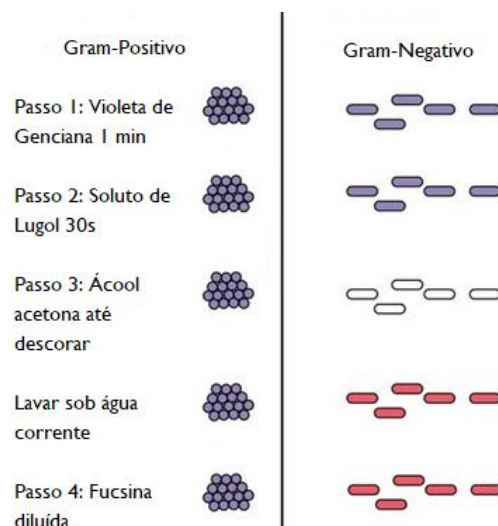


Figura 1: Técnica de Coloração de Gram [Adaptada de Microbiologia Médica, Murray (7th ed)]

Um microrganismo Gram-negativo possui uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas, enquanto um microrganismo Gram-positivo tem uma camada espessa de peptidoglicano que contém os ácidos teicóico e lipoteicóico como está representado na Fig. 2 (Murray e Rosenthal, 2014).

Para corar um esfregaço deve proceder-se inicialmente à fixação pelo calor, após o que se adiciona o corante primário, violeta de genciana. Os corantes usados têm características básicas, que lhes conferem afinidade para estruturas com carga negativa. Em seguida adiciona-se o soluto de lugol que permite a precipitação do corante primário, seguindo-se o descorante, álcool-acetona, gota-a-gota, que solubiliza os fosfolípidos da membrana externa de microrganismos Gram-negativo, permitindo a saída do corante primário. Após lavagem em água corrente, adiciona-se o corante secundário, fucsina diluída, que se liga às estruturas dos microrganismos Gram-negativo, corando-os de rosa. Pelo contrário, graças à espessa parede dos microrganismos Gram-positivo, o violeta de genciana fica retido e as estruturas ficam com coloração roxa.

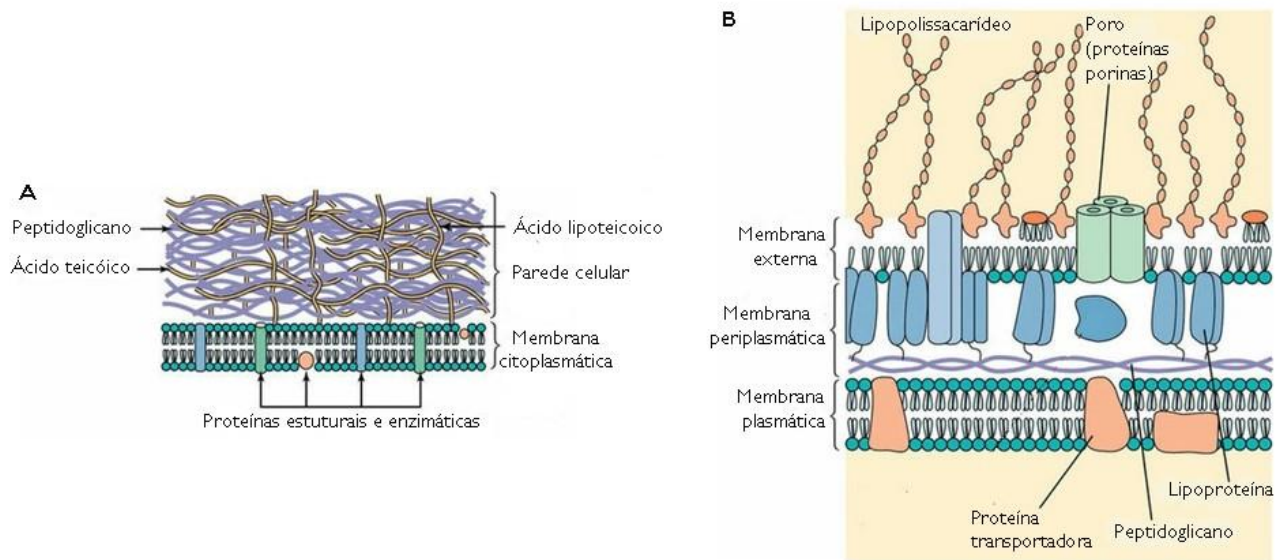


Figura 2: Comparação entre as estruturas das paredes celulares de bactérias Gram-positivo (A) e Gram-negativo (B) [Adaptada de Microbiologia Médica, Murray (7th ed)].

No fim, os esfregaços são então observados ao microscópio óptico com objetiva de 50x com o auxílio do óleo de imersão, e são anotadas nas folhas de trabalho as características morfológicas dos microrganismos (Fig. 3).

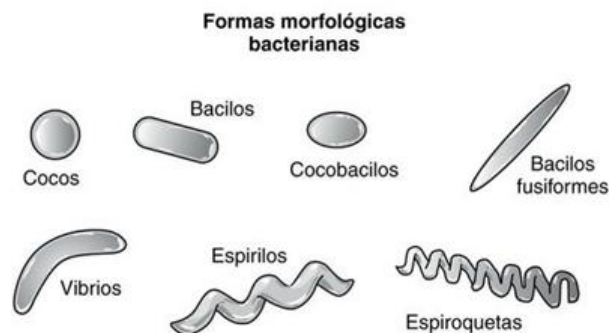


Figura 3: Diferentes formas morfológicas das bactérias [Adaptada de Microbiologia Médica, Murray (7th ed)].

O meio de cultura utilizado para a repicagem de hemoculturas é a Gelose Columbia suplementada com 5% de sangue de carneiro (COS). Este é um meio não seletivo no qual cresce a grande maioria das bactérias e que permite a observação da presença ou não de hemólise e do seu tipo (Fonseca *et al.*, 2004).

A repicagem é efetuada através da técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido. Existem exceções nas quais não se observa desenvolvimento de colónias, apesar de se observarem microrganismos no esfregaço corado pela técnica de Gram, pelo que se deve proceder à sua repicagem para outro meio, uma vez que podemos estar na presença de microrganismos que necessitem de condições específicas, como é o caso das bactérias dos géneros *Haemophilus* e *Neisseria*. Estas necessitam do heme (fator X) proveniente da hemoglobina e de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) também conhecida como fator V (Murray e Rosenthal, 2014). Para pesquisa destes microrganismos utiliza-se o meio de gelose de chocolate suplementado com Polivitex X (PVX), no qual é adicionado NAD e o sangue presente é cozido para a libertação dos fatores existentes dentro dos eritrócitos. Tanto o meio COS como o PVX são incubados durante 24 a 48 horas a 37°C.

Sempre que uma hemocultura para pesquisa de micobactérias for positiva deve proceder-se à repicagem para COS e realizar um esfregaço com coloração de Gram de modo a despistar o crescimento de microrganismos que não micobactérias, efetuar um esfregaço corado pela técnica de Kinyoun e repicar para meio Löwenstein-Jensen (LJ). Caso a coloração de Kinyoun seja positiva procede-se à pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por Biologia Molecular.

A coloração de Kinyoun é uma técnica de coloração para bacilos Ácido-Álcool-Resistentes (BAAR) (Tabela 3), isto é, para bactérias que possuem uma composição da parede celular completamente diferente das restantes.

Tabela 3: Descrição da Técnica de Coloração de Kinyoun

Passo 1	Corante Carbofucsina	4 minutos
Passo 2	Descorante Álcool Ácido	Até descorar
Passo 3	Corante Verde Brilhante	30 segundos

A parede celular das micobactérias é rica em lípidos, o que lhes confere características hidrofóbicas e resistência a vários desinfetantes e colorações comuns de laboratório. Uma vez corados, os bacilos adquirem coloração vermelha e não são descorados com soluções ácidas. Pelo facto de a parede celular das micobactérias ser complexa e este grupo de microrganismos ser exigente, muitas micobactérias crescem lentamente, dividindo-se a cada 12-24 horas requerendo muitas das vezes um período de cerca de oito semanas para que o crescimento seja detetado em culturas de laboratório (Murray e Rosenthal, 2014).

A cultura de micobactérias efetua-se em meio LJ, um meio sólido em tubo, com gema de ovo que contribui com os lípidos necessários ao crescimento destes bacilos (Brooks *et al.*, 2014). A inoculação é feita à superfície do tubo e a incubação ocorre numa estufa a 37°C sem CO₂, durante um período mínimo de 2 meses. A pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por técnicas de Biologia Molecular é feita por Real Time PCR no equipamento GeneXpert® Cepheid.

Uma vez que o sangue é um produto estéril, todos os isolamentos de microrganismos patogénicos devem ser reportados à Direção Geral de Saúde (DGS). Os **microrganismos isolados do sangue**, mais comuns na Microbiologia do SPC do IPO de Coimbra são Enterobactérias (***Proteus spp*, *Echerichia coli* e *Klebsiella spp***) ***Staphylococcus aureus*** e leveduras do género ***Candida***.

Urina

A urina é o produto mais comum do setor de Microbiologia e, assim como o sangue, é habitualmente um produto estéril. Contudo, os microrganismos conseguem chegar ao trato urinário pela uretra, a via mais comum pela qual há desenvolvimento de infeções neste local. Esta evidência explica o facto de a urina ser um produto propício ao desenvolvimento de microrganismos, especialmente em doentes algaliados em contexto hospitalar (Madigan *et al.*, 2012).

A designação da infeção varia consoante o local em que esta se instala. Cistite por exemplo, é uma infeção na bexiga, ao passo que pielonefrite diz respeito a uma infeção no rim (Grabe *et al.*, 2017). Quando há suspeita de infeção no trato urinário a amostra de urina chega ao laboratório num contentor estéril após a colheita do jato médio, da primeira micção da manhã, precedida de higienização, ou por punção de catéter urinário, punção supra-púbica ou drenagem de nefrostomia /ureterostomia (Fonseca *et al.*, 2004).

- **Urocultura**

A urocultura consiste na quantificação dos microrganismos presentes na urina. O processamento da amostra de urina inicia-se com a realização da sementeira. A sementeira do produto para quantificação dos microrganismos é feita em 2 meios distintos com uma ansa calibrada de 10µl, através da técnica de sementeira quantitativa representada na Figura 4. Considera-se positiva uma amostra com contagem de colónias >10⁵ UFC/ml.

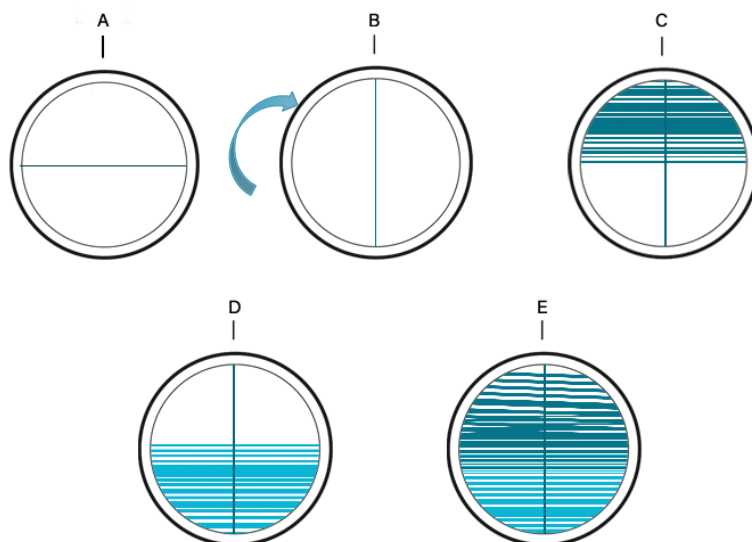


Figura 4: Técnica de Sementeira Quantitativa de urinas: A para E

Os meios utilizados são:

- O meio de Cistina- Lactose - Deficiente de Eletrólitos (CLED), um meio não seletivo e diferencial que, como o nome indica, devido à deficiência de eletrólitos, inibe o “swarming” do *Proteus* spp. e, através da presença da lactose e um indicador de pH (azul de bromotimol), permite diferenciar os fermentadores dos não fermentadores;
- O meio Gelose Columbia com sangue, colistina e ácido nalidíxico (CNA), ideal para bactérias Gram-positivo, uma vez que a colistina e o ácido nalidíxico inibem o crescimento da maior parte das Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp..

Caso se observe o crescimento de colónias com aspeto morfológico homogéneo e em contagem $>10^5$ UFC/ml a cultura segue para identificação dos microrganismos responsáveis pela infeção e respetivos TSA. Por outro lado, se se verificar o crescimento de 3 ou mais colónias com características diferentes, é reportado ao clínico a existência de flora polimicrobiana.

Os **microrganismos comumente encontrados nas culturas de urina** do SPC são Enterobactérias como é o caso da *Echerichia coli* (Fig. 5), *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. (Fig.5), *Enterobacter* spp. e *Enterococcus faecalis*.

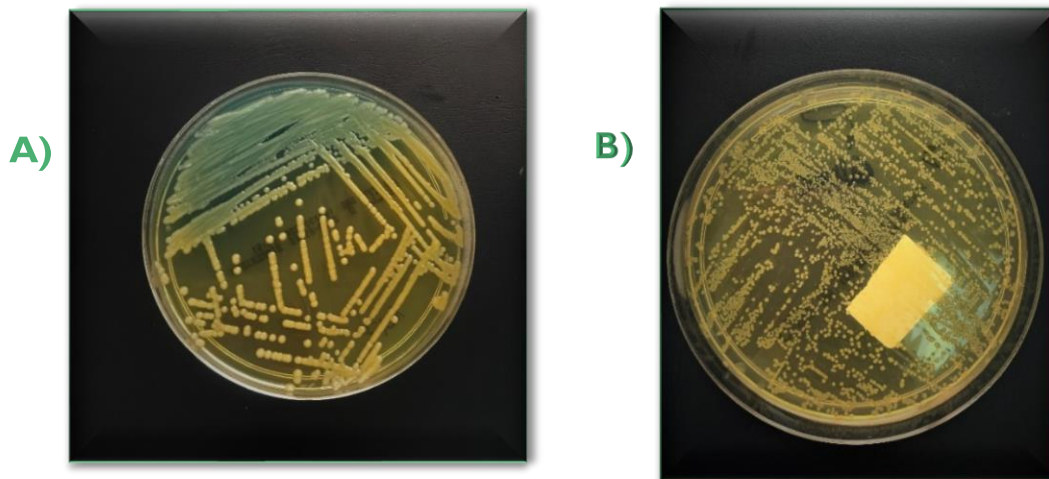


Figura 5: Fotos de microrganismos isolados de amostras de urina do SPC. A- *Klebsiella pneumoniae*; B- *Escherichia coli*, em ambas se observam colônias amarelas, fermentadoras da lactose.

- **Sumária de Urina**

Em paralelo, e embora se trate de uma análise maioritariamente bioquímica, dá-se início ao processamento da sumária de urina. Esta análise realiza-se no setor de Microbiologia meramente por conveniência no que diz respeito ao manuseamento das amostras de urina, uma vez que seria sempre necessário efetuar o sedimento urinário aquando da urocultura.

A sumária de urina consiste na avaliação semiquantitativa de vários parâmetros bioquímicos e na observação do sedimento urinário. Para tal, utiliza-se uma tira com reagentes que vai ser lida no equipamento Cobas u41 I da Roche, de forma automática, analisando parâmetros como o pH, corpos cetónicos, urobilinogénio, proteínas, bilirrubina, eritrócitos, leucócitos, nitritos, glicose e cor tendo o TSDT apenas a tarefa de atribuir o aspeto da amostra em termos de turvação. Para observação do sedimento urinário, centrifuga-se a amostra durante 5 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, o sedimento é observado ao microscópio ótico na objetiva de 40x, entre lâmina e lamela, para pesquisa de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros ou cristais.

Produtos Respiratórios

Uma vez que se trata de um hospital oncológico, as infeções respiratórias, são maioritariamente do trato respiratório inferior. Como tal, as amostras de produtos respiratórios que chegam ao setor de Microbiologia variam entre Aspirados Brônquicos, Lavados Bronco-Alveolares, Lavados Brônquicos, Expetorações ou Líquidos Pleurais. Estes produtos são semeados em COS e PVX a 37°C durante 24 a 48h e em duas geloses de Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC2) durante 30°C e 37°C, sendo que esta gelose corresponde a um meio seletivo utilizado para o isolamento e cultura de fungos.

Os produtos são semeados por técnica de sementeira por esgotamento do produto à superfície do meio sólido, à exceção das amostras de Lavados Bronco-Alveolar, que se semeiam por técnica quantitativa. Em adição, os produtos líquidos e que sejam pouco representativos são também semeados em meios líquidos de enriquecimento. Exemplos destes utilizados no SPC, são o meio de Schaedler líquido (KCS) e o meio Brain Heart Infusion (BHI). O primeiro consiste num meio reduzido sem radicais de O_2 com vitamina K, o que o torna específico para microrganismos anaeróbios (Dickinson, 2015). Já o BHI é um meio muito enriquecido de utilização geral, adequado para a cultura de uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Dickinson, 2013a). Se existir crescimento de microrganismos os meios turvam e é necessária a sua repicagem, especialmente para a gelose de Shaedler sólido com 5% de carneiro (SCS) em atmosfera de anaerobiose durante 5 dias, de modo a potenciar o crescimento em placa de colónias anaeróbias. A atmosfera em anaerobiose é atingida com o recurso a sacos GENbag que possuem um gerador da atmosfera pretendida e uma tira indicadora da presença ou ausência de oxigénio. Se estiver tudo a funcionar de forma correta, a tira fica branca, caso contrário, se houver presença de O_2 dentro do saco, a tira fica azul. É também semeado em meio COS como forma de “controlo ar”, ou seja, se o crescimento no SCS for de facto de microrganismos anaeróbios estritos, “o controlo ar” vai ser negativo, se for positivo significa que estamos na presença de anaeróbios facultativos que tanto crescem em anaerobiose como na presença de O_2 .

Em paralelo é realizado um esfregaço da amostra com coloração de Gram, que no caso das amostras de expetoração, tem como objetivo verificar se estas são verdadeiras expetorações ou não. Deste modo, caso a expetoração apresente muitas células epiteliais e poucos leucócitos, corresponde a contaminação com secreções da orofaringe, podendo na maioria das vezes tratar-se de uma contaminação do trato respiratório superior (Fig. 6). Na Tabela 4 estão representados os critérios de Murray-Washington que avaliam a qualidade das amostras de expetoração quando coradas com a coloração de Gram na objetiva de 10x em pelo menos 10 campos.

Tabela 4: Critérios de Murray-Washington: Avaliação da qualidade das amostras de expetoração com coloração de Gram (Fonseca *et al.*, 2004).

	Células epiteliais	Leucócitos
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

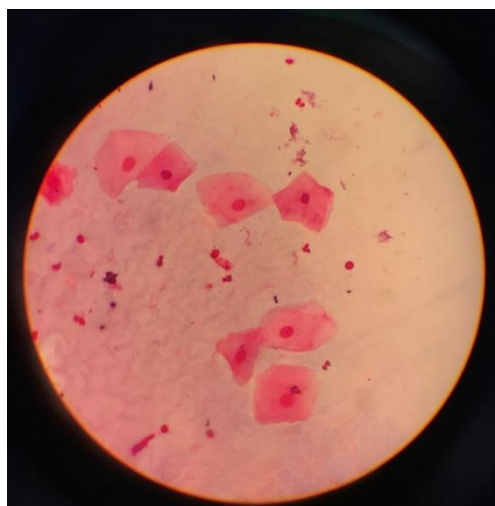


Figura 6: Aspeto de uma amostra contaminada com secreções da orofaringe onde se podem observar muitas células epiteliais.

- Pesquisa de Micobactérias

Tendo em conta o contexto hospitalar em que os doentes se inserem, muitos deles imunocomprometidos, estão sujeitos tanto a microrganismos oportunistas, que normalmente não infetam pessoas saudáveis, como a microrganismos patogénicos como é o caso de *Mycobacterium tuberculosis*.

Quando há suspeita de BAAR, é feito inicialmente um exame direto da amostra corada pela técnica de Kinyoun. De seguida, para aumentar a sensibilidade da sementeira e do exame direto, uma vez que se trata de organismos muito fastidiosos, e para eliminar a contaminação com microrganismos comensais do trato respiratório, é necessário proceder-se à descontaminação e homogeneização das amostras. Esta técnica é realizada com recurso a

hidróxido de sódio (NaOH) para a descontaminação e N-acetilcisteína para solubilização da amostra (Brooks *et al.*, 2014). Após este passo as amostras são tamponadas e centrifugadas, sendo o concentrado inoculado em LJ e COS. Este último consiste num controlo da qualidade da descontaminação através da verificação de crescimento de outros microrganismos que não micobactérias.

Os **microrganismos patogénicos mais comuns** das amostras de **produtos respiratórios** no contexto do IPO são Enterobactérias, *Pseudomonas spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*.

Exsudatos

- Exsudato purulento superficial

Este tipo de exsudato tende a ser o mais comum devido às feridas existentes nos locais de sutura nos doentes que foram sujeitos a cirurgias ou em doentes que possuem diabetes, concomitantemente com a situação oncológica.

- Exsudato purulento profundo

Estas amostras são também bastante comuns devido à formação de abscessos, tanto devido a intervenções cirúrgicas, como inserção de cateteres para administração das terapêuticas.

Infeções de feridas e abscessos são frequentemente contaminados com microrganismos da flora comensal da pele e por isso, amostras colhidas destas lesões com o auxílio de uma zaragatoa, podem induzir em erro. Para abscessos e lesões purulentas, a melhor forma de executar a colheita seria por aspiração do pús com uma seringa e agulha esterilizadas, após desinfeção da superfície da pele (Madigan *et al.*, 2012). No SPC, o modo de colheita das amostras varia, caso se tratem de feridas abertas ou fechadas. Se se tratar de uma ferida aberta, a amostra é colhida com uma zaragatoa com meio de Stuart, de modo a preservar os microrganismos durante o seu transporte para o laboratório ou, caso drene, para contentor esterilizado. Se a ferida for fechada, é puncionada e transportada ao laboratório o mais rapidamente, devido à possibilidade de os microrganismos responsáveis pela infeção serem anaeróbios. Por esta razão, além da coloração de Gram feita no produto e dos meios utilizados habitualmente para bactérias aeróbias, COS, PVX, e SGC2, para fungos, os exsudatos profundos são também inoculados em BHI, KCS e SCS em anaerobiose. Tanto os meios sólidos como os meios líquidos são incubados a 37°C durante 24 a 48h.

Microrganismos mais comuns em amostras de **exsudatos purulentos superficiais e profundos**: *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* e poucos anaeróbios provavelmente devido à má colheita ou condições inadequadas de transporte.

- **Exsudatos Vaginais**

Este tipo de amostra não é tão comum tendo-me sido possível observar apenas o processamento de uma amostra de exsudato vaginal. A sua colheita e processamento é semelhante aos restantes tipos de exsudatos, com a exceção de algumas particularidades. Exsudatos vaginais não podem ser refrigerados (pois caso haja presença de *Neisseria gonorrhoeae* esta morreria com as baixas temperaturas) e o seu exame direto a fresco é feito com gotas de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% entre lâmina e lamela ao microscópio ótico, na objetiva de 40x, para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis* e elementos leveduriformes. Além do exame direto a fresco são efetuados também esfregaços para corar pela técnica de Gram para pesquisa de leucócitos e “clue cells”, células escamosas epiteliais da vagina que estão cobertas por cocobacilos anaeróbios com coloração de Gram variável, características de *Gardnerella vaginalis* (Khan et al., 2007).

Microrganismos mais comuns nos **exsudatos vaginais** do SPC: *Gardnerella vaginalis* e *Candida* spp..

Biópsias

As biópsias são colhidas pelo clínico e devem ser transportadas em contentor estéril (Fonseca et al., 2004). As biópsias que chegam ao Sector de Microbiologia do SPC com maior frequência são as punções ganglionares. Estas devem ser maceradas antes de ser efetuado esfregaço para coloração de Gram e Kinyoun, se solicitada a pesquisa de BAAR, e sementeira. A sementeira é efetuada em gelose COS, PVX e 2 SGC2 e incuba a 37°C e 30 °C, para o caso da segunda placa de SGC2, para além de KCS e BHI. A repicagem de meios líquidos para meios sólidos acontece sempre e é obrigatória, haja turvação ou não (KCS para anaerobiose e aerobiose e BHI para COS) e executa-se sempre esfregaço corado pelo Gram. Quando necessário, e se solicitado, as amostras são analisadas por Biologia Molecular para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*, no GeneXpert® Cepheid.

Pontas de Cateter

Os cateteres são uma das principais vias de acesso dos microrganismos ao sangue. Assim, quando há estabelecimento de infecções tanto a nível local, como a nível sistémico, é necessário proceder-se à sua remoção e análise, de forma a perceber se estes são o foco da infeção ou não.

As pontas de cateter a enviar ao laboratório devem ter exatamente 5 cm e são rodadas à superfície de uma placa de COS pela Técnica de MAKI (Técnica de sementeira quantitativa) e incubadas 24h a 37°C. Após este período se se desenvolver um nº de colónias >15 estamos perante uma infeção e se <15 colónias colonização (Fonseca *et al.*, 2004). Em paralelo são também colocadas em meio de enriquecimento BHI, para potenciar o crescimento de possíveis microrganismos colonizadores do interior do cateter. O meio de BHI é repicado para COS nas mesmas condições anteriormente descritas.

Os **microrganismos patogénicos mais comuns** nas infeções por **cateteres** são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus coagulase* negativa.

Fezes

Os sintomas agudos atribuíveis ao trato gastrintestinal, sobretudo náuseas, vómitos e diarreia, são comumente atribuídos a infeção. Uma grande variedade de bactérias pode provocar infeções gastrointestinais. Para que essas bactérias possam ser isoladas na cultura, uma amostra de fezes adequada deve ser colhida em 3 dias consecutivos, transportada para o laboratório de uma maneira que assegure a viabilidade do organismo infetante e inoculada em meios seletivos apropriados. As amostras devem ser transportadas imediatamente ao laboratório para evitar sua acidificação (consequência do metabolismo bacteriano), que é tóxica para alguns organismos (p. ex., *Shigella* e *Salmonella*) (Brooks *et al.*, 2014).

No setor de Microbiologia do SPC a atenção é dirigida principalmente para a pesquisa destes agentes patogénicos e de *Campylobacter* sp.. Sempre que há suspeita clínica, outros microrganismos podem ser pesquisados.

- Isolamento de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp.

A amostra de fezes é semeada em meios eletivos da flora entérica como é o caso dos meios desoxicolato-lisina-xilose (XLD) e Hecktoen.

O meio XLD é um meio de cultura, moderadamente seletivo, utilizado para o isolamento e diferenciação de patógenos entéricos Gram-negativo: *Salmonella* sp. e *Shigella* sp.. O desoxicolato de sódio funciona como agente seletivo, possuindo uma ação inibitória em relação aos microrganismos Gram-positivo. A xilose é incorporada no meio, uma vez que é fermentada por praticamente todos os patógenos entéricos, exceto pelas bactérias do género *Shigella*, permitindo esta característica a diferenciação das diferentes espécies deste género. A lisina é incluída de modo a permitir que o grupo de *Salmonella* spp. seja diferenciado dos agentes não patogénicos, uma vez que, sem a lisina, estas bactérias rapidamente fermentariam a xilose, tornando-se impossível distingui-las das espécies não patogénicas. É ainda adicionado a este meio um sistema indicador de sulfureto de hidrogénio (H₂S), constituído por tiosulfato de sódio e citrato de amónia férrico para a visualização do H₂S produzido, resultando na formação de colónias com centros negros característicos das bactérias do género *Shigella* (Dickinson, 2013b).

O meio Hecktoen é utilizado para o mesmo fim do XLD, contudo, a adição da lactose, sacarose e salicina permitem uma diferenciação ótima entre a cor das colónias e a do meio adjacente às mesmas. As espécies de *Salmonella* e *Shigella* não fermentam estes compostos e, por conseguinte, não provocam uma alteração da cor do meio (Dickinson, 2013c).

As colónias suspeitas (não fermentadoras da lactose) são repicadas para CLED. Se for possível reconhecer a morfologia das colónias em meio de CLED como de enterobactérias, o processo de identificação fica concluído, caso contrário terá de se proceder à sua identificação pelas cartas de ID.

De forma a promover o crescimento das bactérias *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., as amostras de fezes são também semeadas em paralelo nos meios de enriquecimento Selenito F e Caldo de Gram Negativo (GN). O caldo Selenito F possui propriedades inibidoras de Enterobactérias, como é o caso de *Escherichia coli*, enquanto o caldo GN ao possuir desoxicolato e citrato inibe bactérias Gram-positivo e a elevada concentração de manitol limita o crescimento do género *Proteus* spp. ao mesmo tempo que facilita o crescimento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Fonseca et al., 2004).

- Pesquisa de *Campylobacter* sp

A pesquisa de *Campylobacter* sp. nas fezes é feita por método imunocromatográfico em cassetes de RIDA QUICK *Campylobacter* (Fig. 7), que pesquisam antígenos de *Campylobacter* sp..

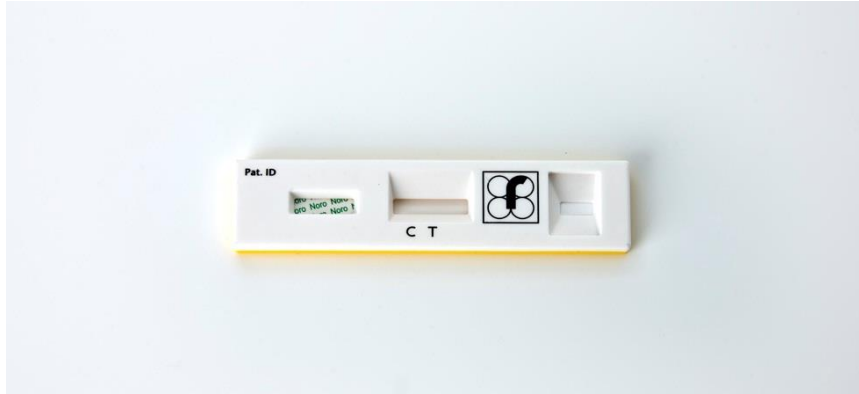


Figura 7: Cassete para teste imunocromatográfico de RIDA QUICK *Campylobacter*. Fonte: <https://clinical.r-biopharm.com/>

Quando este teste dá positivo, ocorre o aparecimento de duas bandas na zona C e T. É necessário semear-se a amostra em meio seletivo CampyloSel, um meio seletivo para *Campylobacter* sp. devido à presença de sangue e diferentes tipos de antibióticos, que inibem bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. A incubação deve ser feita a 42°C numa atmosfera de microaerofília [5% oxigénio (O₂) + 10% CO₂ + 85% de azoto (N₂)] durante 3 dias, uma vez que a maioria das enterobactérias não cresce a esta temperatura, e o género *Campylobacter* quando exposto à nossa atmosfera por muito tempo, acaba por morrer. Para identificar a espécie, *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli* recorre-se às cartas de ID.

- Pesquisa de *Clostridium difficile*

A norma 19/2014 da DGS estabelece que a pesquisa da bactéria *Clostridium difficile* tem de ser feita em doentes internados com diarreia à mais de 72h, ou admitidos com diarreia, e na comunidade em doentes com diarreia com 65 ou mais de 65 anos de idade (Direção Geral de Saúde, 2015). A pesquisa de *C.difficile* é feita através da pesquisa da enzima Glutamato Desidrogenase por método imunocromatográfico RIDA QUICK *Clostridium difficile*, sendo que o modo de leitura da cassette é igual ao anterior.

- Pesquisa da Toxina B e Toxina Binária

Se o teste imunocromatográfico for positivo, está estabelecido pela norma 19/2014 que se deve proceder a testes confirmatórios, que no setor de microbiologia do SPC, se realizam através da pesquisa do gene da toxina B e do gene da toxina binária por PCR em tempo real

no equipamento GeneXpert®. Se esta pesquisa também for positiva, o resultado é dado como *Clostridium difficile*, produtor de toxina, se negativo é dado como equívoco e deve repetir-se a colheita (Direção Geral de Saúde, 2015).

Saliento que é dever reportar a positividade de *Clostridium difficile* toxigénico à DGS.

- **Pesquisa de Parasitas**

Na eventualidade de existirem parasitas nas fezes, e embora nos dias de hoje não seja algo assim tão comum, é necessário realizar-se:

– Exame macroscópico (para visualização de eventuais parasitas ou partes de parasitas).

– Exame direto com Lugol ao microscópio ótico para observação de ovos e quistos, mobilidade e morfologia dos diversos parasitas que poderão existir nas fezes.

– Exame após concentração, pelo método de Ritchie, também ao microscópio ótico para pesquisa de ovos e quistos de parasitas. Este exame deve ser complementado com o exame direto uma vez que os ovos leves se perdem no processo de centrifugação.

Para pesquisa de ovos, utiliza-se a objetiva de 10x e para as restantes estruturas a de 40x.

Deve também efetuar-se um exame direto corado pela técnica de Kinyoun para pesquisa de *Cryptosporidium* sp. e método imunocromatográfico combinado para pesquisa de *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp..

Microrganismos mais comuns nas fezes (apesar de ser raro aparecerem no SPC): *Campylobacter* sp., *Clostridium difficile* toxigénico, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp..

Fâneros (Pele, Cabelo e Unhas)

Os fâneros são enviados para sector de Microbiologia do SPC para exame micológico quando há suspeita de micoses. As micoses cutâneas são causadas por fungos que só infetam o tecido queratinizado (pele, cabelos e unhas). Os mais relevantes são os dermatófitos, um grupo com mais de 40 fungos relacionados que pertencem a três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (Brooks et al., 2014).

É realizado um exame direto com hidróxido de potássio (KOH) a 10% para cabelo e pele e 30% para as unhas. Este atua durante uma hora de forma a dissolver a queratina. A preparação é observada entre lâmina e lamela ao microscópio ótico na objetiva de 40x para pesquisa das

estruturas fúngicas. A sementeira é feita em 5 pontos de cada face do sistema Mycoline®, que contém de um lado meio SGC2 e do outro Sabouraud + Actidiona e Cloranfenicol, de modo a inibir o crescimento de fungos saprófitas e potenciar o de fungos dermatófitos. São ainda semeados dois meios SGC2, em que um incuba a 25°C e outro a 30°C. Os fungos filamentosos que crescerem nos meios são igualmente observados ao microscópio ótico pela técnica da fita cola, e na presença de azul lactofenol. A identificação, ao contrário dos restantes produtos, não é feita por cartas ID, mas pela observação microscópica de estruturas fúngicas reprodutivas.

Os microrganismos mais comuns isolados a partir de **fâneros** no setor de Microbiologia do SPC são *Trichophyton rubrum* e ocasionalmente, *Trichophyton mentagrophytes*.

Identificação e TSA

No SPC, procede-se à identificação de microrganismos com cartas ID, associadas a provas bioquímicas rápidas e características morfológicas da cultura, como por exemplo o tipo de hemólise evidenciada em gelose COS.

- Tipos de Hemólise

γ -hemólise: microrganismos não hemolíticos, sem modificação no meio de cultura.

α -hemólise: microrganismos que apresentam hemólise parcial, caracterizada por uma zona cinza-esverdeada em torno das colónias.

β -hemólise: microrganismos que fazem hemólise total do meio, ocorrendo uma zona transparente (lise total das hemácias) ao redor das colónias (Fig. 8).

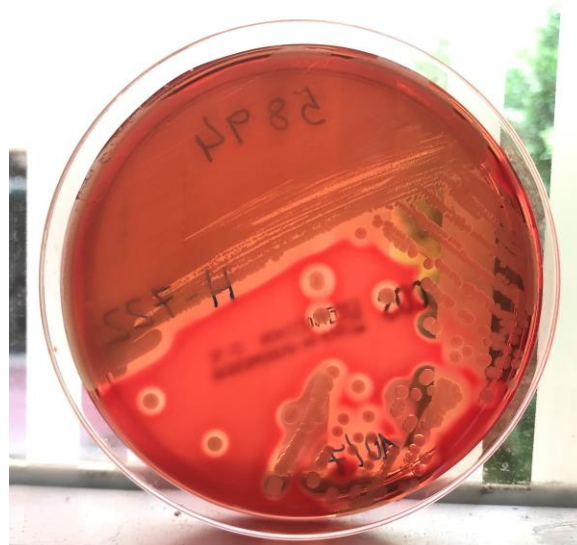


Figura 8: Exemplo de β -hemólise produzido por *Staphylococcus aureus*.

- Teste da Citocromo-Oxidase

A citocromo-oxidase é uma enzima que atua na cadeia final de transporte de elétrons da respiração. Uma vez que as Enterobactérias não produzem esta enzima, ao contrário de outros bacilos Gram-negativo, como por exemplo *Pseudomonas* sp., este teste é utilizado para os diferenciar. A reação dá-se como positiva com o aparecimento da cor violeta em 10 a 60s após a adição do microrganismo ao reagente tetrametil-p- fenilenediamina dihidroclorato. Uma vez ultrapassado este período, o teste torna-se inviável devido à própria exposição ao ar (Fonseca et al., 2004).

- Teste da Catalase

De forma a distinguir o género *Staphylococcus* de *Streptococcus* sp., recorre-se à pesquisa da enzima catalase, presente no género *Staphylococcus*. A catalase é a enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água, segundo a reação:



O peróxido de hidrogénio, ao ser decomposto na presença desta enzima, faz com que haja libertação de oxigénio, ocorrendo a formação de bolhas, e o teste é dado como positivo (Fonseca et al., 2004).

- Teste de Optoquina

Optoquina é uma substância que permite a diferenciação de *Streptococcus pneumoniae* (suscetível) de outros estreptococos alfa-hemolíticos (ex *Streptococcus viridans*). Neste teste, utiliza-se um disco impregnado com optoquina, que é colocado no centro de um meio que permita o crescimento do género *Streptococcus* (neste caso COS) após a sua inoculação. O meio é colocado a incubar a 37°C durante 24 a 48h, de modo a que seja possível verificar se há presença ou ausência de um halo de inibição em torno do disco (Fonseca et al., 2004).

- Teste da Bacitracina

A bacitracina é um antibiótico que possui atividade contra a maioria das bactérias Gram-positivo, à exceção de Estreptococos β-hemolíticos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) que é resistente. Desta forma, este teste é essencialmente utilizado para diferenciar colónias de estreptococos que apresentem β -hemólise. Feita a sementeira, e após 24h a 37°C, qualquer halo de inibição indica identificação presuntiva de *Streptococcus* hemolítico do grupo A

(*Streptococcus pyogenes*), sendo que a ausência de halo de inibição é interpretada como *Streptococcus* hemolítico não grupo A (Fonseca et al., 2004).

- Teste da Novobiocina

Este teste serve para distinguir o *Staphylococcus saprophyticus*, que se mostra resistente à novobiocina, de outras estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa. Para a realização do teste, inocula-se a gelose Mueller-Hinton E (MHE) pela técnica de sementeira em toalha. Após 24h a 37°C ausência de halo indica que estamos perante a espécie *Staphylococcus saprophyticus* (Fonseca et al., 2004).

- Cartas de Identificação e TSA

Para identificação e realização de TSA automáticos é utilizado o equipamento Vitek® 2 Compacto I5. Este funciona com cartas de ID e TSA que são lidas por densitometria e colorimetria.

Para se realizar este tipo de identificação e de modo a que esta seja o mais específica possível, é necessário garantir que as colónias com que estamos a trabalhar são puras. Para tal é feita uma suspensão com a densidade MacFarland ajustada a cada tipo de carta, como indica a Tabela 5, que é posteriormente também semeada num meio adequado que serve como cultura controlo ID.

Tabela 5: Diferentes tipos de cartas de ID e respetivos valores de densidade adequados para suspensão dos microrganismos.

Carta ID	Densidade MacFarland
GN: Gram negativo	0.6-0.63
GP: Gram positivo	0.6-0.63
YST: Leveduras	1.8-2.20
ANC: Anaeróbios e <i>Corynbacterium</i> sp.	2.70-3.30
NH: <i>Neisseria</i> sp. e <i>Haemophilus</i> sp.	2.70-3.30

Para a realização das cartas ID e TSA deve partir-se de colónias de microrganismos o mais livres possível de fatores condicionantes do seu crescimento (antibióticos, anti-inflamatórios etc). Os TSA são feitos de acordo com o género em que o microrganismo se insere. Por exemplo, se estivermos a utilizar uma carta para Gram-negativo não podemos utilizar uma carta de TSA para o género *Staphylococcus*. Para tal, da suspensão feita para as cartas de ID,

são retirados 280 e 145 µL para a realização de TSA de Gram-positivo/leveduras e Gram-negativo, respetivamente.

As cartas de TSA utilizadas no Vitek® pelo laboratório de Microbiologia do SPC são:

- 355: Enterobactérias
- 373: *Pseudomonas* sp. e microrganismos multirresistentes
- 648: *Staphylococcus* sp.
- 586: *Enterococcus* sp. e *Streptococcus* β-hemolíticos
- ST-03: *Streptococcus* sp.
- YS08: Leveduras

No final da leitura dos resultados o equipamento transmite a informação para o sistema informático Modulab, com a identificação do microrganismos e os antimicrobianos a que este é sensível ou resistente, de acordo com as normas EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

- Sistema BD BBL™ Crystal™

No SPC recorre-se ao uso do sistema BD BBL™ Crystal™ Gram Positivo, quando a identificação no sistema automatizado de algum microrganismo Gram-positivo não é possível. Este sistema consiste num método de identificação que utiliza substratos fluorogénicos e cromogénicos. Os substratos presentes são degradados pelos microrganismos, o que resulta na alteração do pH do meio e mudança da coloração dos poços. Nos 12 poços incolores à esquerda do sistema A) na Figura 9, a leitura é feita por fluorescência ao fazer-se incidir uma luz UV e nos restantes por colorimetria visual (Dickinson, 2019b). É atribuída positividade ou negatividade aos poços de acordo com a carta de leitura B) para a zona de colorimetria: por exemplo, o último poço do canto inferior direito com a coloração roxa é considerado positivo.

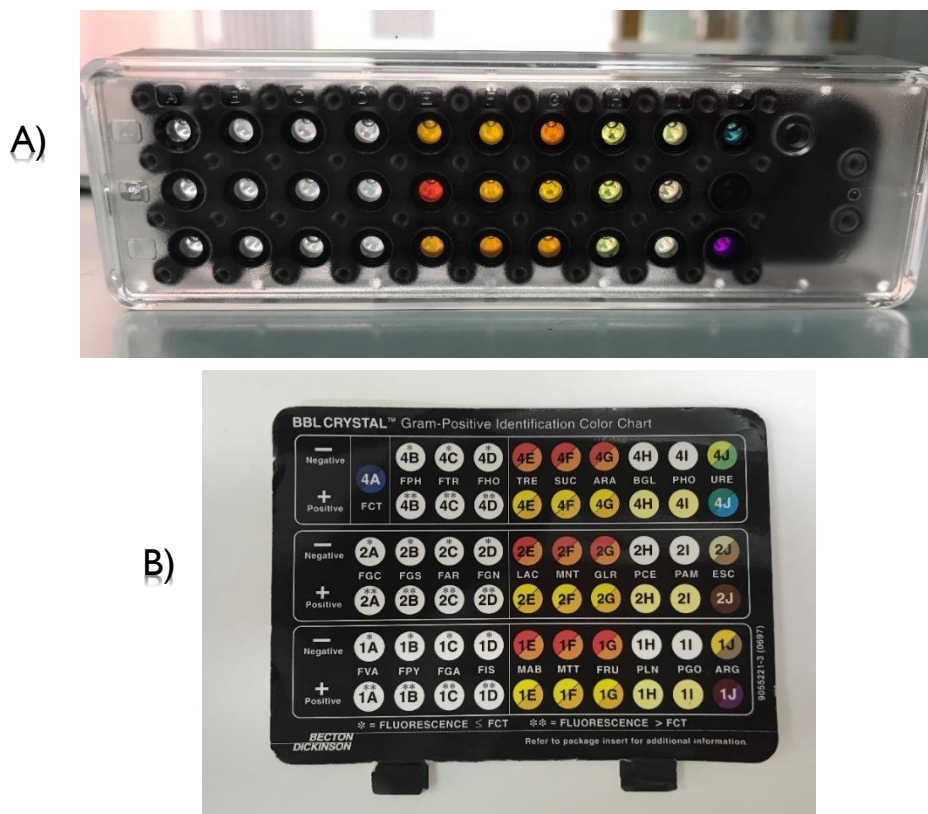


Figura 9: A) Sistema BD BBL™ Crystal™ Gram Positivo. B) Carta de leitura do sistema BD BBL™ Crystal™ Gram Positivo

Caso os poços sejam positivos são atribuídos 4, 2 ou 1 “ponto” à primeira, segunda e terceira linha respetivamente. Feita a leitura os pontos são somados na vertical e o bionúmero resultante é inserido numa base de dados que nos indica qual o microrganismo em causa e com que probabilidade.

Antibiogramas Manuais

No SPC efetuam-se TSA por método de Kirby-Bauer sempre que há necessidade de confirmar TSA ou nos casos em que não há cartas automatizadas para os microrganismos em causa. São efetuados segundo os procedimentos recomendados pelas normas EUCAST, em gelose MHE ou gelose Mueller-Hinton + 5% Sangue de cavalo + 20mg/l β -NAD (MHF). A gelose é inoculada com uma suspensão dos microrganismos, com uma densidade de 0.5 MacFarland, pela técnica de sementeira em toalha, e a interpretação dos resultados é feita através da leitura do diâmetro dos halos de inibição. Assim como no TSA automatizado, a estirpe é dada como sensível, intermédio ou resistente segundo as normas de EUCAST.

- Pesquisa de β Lactamases de Espetro Alargado (ESBLs) e Carbapenemases

As ESBLs são β - lactamases com atividade contra todas as penicilinas e cefalosporinas que têm vindo a ser cada vez mais encontradas em determinadas espécies de bacilos Gram-negativo como é o caso de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (Brooks et al., 2014). A sua pesquisa é feita de acordo com os procedimentos descritos nas normas EUCAST. Quando há uma estirpe que produz uma Amp C (enzima cromossômica que hidrolisa Cefalosporinas), para a realização deste teste é necessário utilizar-se uma Cefalosporina de 4ª geração (mais estável à hidrólise). Caso contrário, usamos Cefalosporinas de 3ª geração. Em adição, junta-se um disco de antibiótico com inibidor de β Lactamases (por exemplo Amoxicilina com Ácido Clavulânico), e se houver sinergismo (distensão do halo por diminuição dos mecanismos de resistência), o teste é dado como positivo para presença de ESBLs.

Nos últimos anos, a resistência aos antibióticos carbapenemos, mediada pela produção de carbapenemases, tornou-se problemática. As carbapenemases foram descritas numa ampla variedade de bactérias, incluindo *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* (a mais comum é *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ou KPC), tornando os organismos que produzem esta carbapenemase resistentes a todos os β -lactâmicos (Murray e Rosenthal, 2014). No SPC, recorre-se ao uso do Faropenem (Carbapenemo) como teste de atividade de carbapenemases (CAT) em enterobactérias, uma vez que dentro do grupo dos Carbapenemos este é o mais sensível e específico. A técnica usa o procedimento Kirby Bauer para avaliar a presença ou ausência de halo de inibição, sendo o último caso suspeito da presença de carbapenemases. Sempre que assim é confirma-se por técnicas de Biologia Molecular, também utilizadas para rastreio a partir de zaragatoas retais. Na figura 10 estão representados a pesquisa de ESBLs e Carbapenemases em meio de cultura, onde se pode observar pesquisa de carbapenemases negativa em ambas as placas e ESBLs positiva à esquerda e negativa na placa à direita.



Figura 10: Pesquisa de ESBLs e Carbapenemases pela técnica de Kirby Bauer em gelose MHE

Controlo de Qualidade no Setor de Microbiologia

- Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno do setor de Microbiologia é diferente de todos os outros setores. Este passa pelo controlo dos novos lotes das placas de cultura, das temperaturas das diferentes estufas existentes no laboratório, e dos diferentes componentes/reagentes utilizados para as técnicas e provas manuais. Sempre que possível são utilizadas estirpes controlo conhecidas para avaliação de colorações, identificações e mesmo TSA, embora ainda não por rotina.

- Controlo de qualidade externo

Em termos de controlo de qualidade externo, o setor de Microbiologia está sujeito à Avaliação externa de qualidade em Bacteriologia Geral, Micologia e Morfologia Parasitária do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Por ano, recebem 4 ensaios, cada um com 4 amostras, para avaliação da Bacteriologia, 4 ensaios com 3 amostras para Micologia e 3 ensaios com nº variável de amostras para morfologia parasitária. Estas amostras são liofilizadas e trazem consigo frascos com solução de reidratação. Cada amostra equivale a um caso clínico devidamente descrito, e o seu processamento deve ser feito consoante esta informação. No fim, os resultados devem ser enviados até à data limite estabelecida pelo INSA.

Bioquímica Clínica

Nos dias de hoje as investigações bioquímicas marcam presença em todos os ramos da medicina e encontram-se intrínsecas na relação médico-doente. O setor de Bioquímica Clínica do SPC foi o local onde decorreu o menor período de estágio, equivalendo este a 15 dias. Devido a esta limitação de tempo, a abordagem escrita da rotina deste laboratório irá ser mais breve, ao contrário do que gostaria.

Amostras

A bioquímica, no enquadramento do IPO, assim como a Imunologia/Hormonologia é o setor que mais amostras recebe. O setor trabalha essencialmente com soro, sangue total venoso e arterial e urina de 24h. O sangue arterial deve ser colhido em condições de anaerobiose, evitando contaminações com o ar ambiente, uma vez que gases como o CO₂ influenciam o pH, e podem interferir com outros parâmetros como é o caso do Cálcio ionizado (dado que este é determinado com base no pH). O tubo contendo heparina de lítio, deve ser bem agitado e devem-se descartar bolhas de ar. Para a obtenção do soro são utilizados tubos com esferas de sílica para acelerar o processo de coagulação de modo a separar o soro das células

sanguíneas. Após dada a entrada dos tubos de sangue total no sistema informático estes são centrifugados durante 10 min a 3000 rpm obtendo-se o soro. No fim deste processo é necessário verificar se os tubos não possuem restos de fibrina e se as amostras se encontram hemolizadas ou lipémicas. Este passo é de extrema importância dado que a fibrina pode entupir os equipamentos na pipetagem, as amostras hemolizadas afetam todos os parâmetros cuja concentração intracelular é significativamente superior à concentração extracelular [como é o caso do K⁺ e da lactato desidrogenase (LDH)] e, amostras lipémicas interferem na absorvância. Amostras de sangue venoso para medição de cálcio ionizado, vêm em dispositivos de colheita da Radiometer[®] que contêm heparina equilibrada eletricamente. Este tipo de dispositivos evita que o cálcio seja consumido no processo de coagulação e compensa os efeitos da adição e ligação que a heparina normal tem na medição do Ca²⁺. Estas seringas especiais e tubos de sangue total com K3EDTA para medição da hemoglobina glicada (HbA1c) e dos marcadores cardíacos são inseridos diretamente nos respetivos equipamentos, após ser dada a entrada no sistema informático.

Equipamentos

Na Tabela 6 estão representados os equipamentos utilizados pelo setor de Bioquímica Clínica do SPC.

Tabela 6: Equipamentos do setor de Bioquímica Clínica.

Equipamento	Metodologia	Funcionalidades
Reflotron[®] Plus Roche[®] Diagnostics	Refratometria	Testes confirmatórios
Rapidlab[®] I265 Siemens	Potenciometria e Amperometria	Gasometrias Ionograma
Cobas[®] 6000 Analyser Series Roche[®] Diagnostics	Potenciometria Espectrofotometria Turbidimetria	Multiparamétrico de amostras urgentes/normais e HbA1c
Cobas[®] c311 Roche[®] Diagnostics	Potenciometria Espectrofotometria Turbidimetria	Multiparamétrico de amostras normais e de HbA1c
ABL 800 FLEX Radiometer[®]	Potenciometria e Amperometria	Gasometrias Cálcio
RapidChem[™] 744 Siemens[®]	Potenciometria	Testes confirmatórios do Ionograma
AQT 90 FLEX Radiometer[®]	Imunoensaio	Teste point of care de Marcadores cardíacos

Princípio dos Equipamentos

- Refratometria

A refratometria baseia-se na medição do índice de refração da luz. O equipamento emite luz intermitente a um comprimento de onda, e esta, quando atinge a zona de reação da tira teste utilizada, é refletida pela superfície com intensidades diferentes de acordo com o parâmetro em análise e a sua concentração. O detetor mede a intensidade da luz refletida baseando-se na alteração de cor produzida e o resultado é determinado pela reflectância medida. No setor de Bioquímica este método é apenas utilizado como teste confirmatório de diferentes parâmetros no qual é possível utilizar soro, sangue total ou plasma, e obter resultados em 2 ou 3 minutos.

- Potenciometria

A Potenciometria consiste na medição da tensão ou do potencial gerado entre dois elétrodos numa célula eletroquímica quando não é aplicada nenhuma corrente externa e a célula se encontra em equilíbrio. A célula é composta por 2 elétrodos (um eléctrodo indicador seletivo e um eléctrodo de referência cujo potencial é constante) ligados pela solução de amostra que conduz iões e um dispositivo de medição. O eléctrodo de referência fornece um potencial fixo e inalterado, ao passo que, o eléctrodo seletivo, responde a alterações na concentração do analito específico que está a ser medido na amostra, desenvolvendo um potencial diretamente relacionado com a atividade ou concentração deste. Uma vez que os dois elétrodos se encontram ligados ao dispositivo de medição, o potencial desenvolvido pela célula é determinado calculando a diferença de potencial entre ambos (Burtis *et al.*, 2016).

- Amperometria

Ao contrário da Potenciometria, os métodos amperimétricos referem-se à medição da corrente ao ser aplicado um potencial constante. A corrente elétrica é medida entre o par de elétrodos que participam na reação de redução ou oxidação e é diretamente proporcional à concentração do analito a medir presente na amostra (Burtis *et al.*, 2016).

- Espectrofotometria

A espectrofotometria consiste na medição da intensidade da luz em comprimentos de onda definidos que atingem uma superfície a partir de uma fonte luminosa. A energia é transmitida por ondas eletromagnéticas que são caracterizadas pela frequência e comprimentos de onda aos quais corresponde uma posição no espectro da luz. Segundo a lei de Beer a concentração de uma substância é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida ou inversamente

proporcional ao logaritmo da luz transmitida. Para a determinação da concentração da substância são necessários um padrão e uma solução de referência com absorvância conhecida de modo a que seja possível fazer o cálculo da equação. O espectrofotômetro existente nos equipamentos deste setor está associado a reações enzimáticas, turbidimétricas e de colorimetria (Burtis *et al.*, 2016).

- **Turbidimetria**

A turbidez de uma amostra diminui a intensidade da luz que a atravessa. A medição desta redução de intensidade da luz é denominada Turbidimetria. Este é um método que avalia a formação de agregados quando é adicionado a uma amostra um reagente que diminua a solubilidade de uma proteína ou quando é adicionado um anticorpo a esta. Estando o agregado formado, este método verifica mudanças de absorvância causadas pela formação do mesmo, ou seja, corresponde à medida da absorvância aparente quando a luz é dispersa pelo agregado ou suspensão de partículas existente na amostra (Burtis *et al.*, 2016).

Parâmetros analisados

Eletrólitos

A manutenção da homeostase da água e do balanço do equilíbrio ácido-base é essencial para a sobrevivência de todos os organismos. Os eletrólitos além de exercerem esta função, servem de cofatores a diversas enzimas e, portanto, concentrações anormais destes, levam a uma variedade de desordens fisiológicas.

- **Sódio**

O sódio é o principal eletrólito do fluido extracelular e cerca de 95% do seu conteúdo total corporal encontra-se neste fluido. Tem um papel significativo na manutenção do volume total corporal, na manutenção da osmolaridade e força osmótica nos fluidos corporais e nos processos de excitação neuromuscular. Por definição, um valor de $\text{Na}^+ < 136 \text{ mmol/L}$ é designado de hiponatremia, que tanto pode significar a existência de depleção do ião por perda ou por diluição. As perdas do ião podem ser de origem gastrointestinal, por ação de diuréticos, dieta deficiente ou perda renal, enquanto situações de diluição são provocadas por excesso de administração de fluidos, insuficiência cardíaca congestiva ou insuficiência renal. Quando os valores de Na^+ se encontram $> 148 \text{ mmol/L}$ estamos perante uma situação de hipernatremia que resulta na maioria das vezes da desidratação (Burtis *et al.*, 2016).

- Potássio

O potássio é o maior catião intracelular, verifica-se que 95 % do K^+ total do corpo se encontra dentro das células. Este desequilíbrio é mantido por mecanismos de transporte ativo que dependem da integridade dos processos metabólicos celulares para que, o gradiente de concentração entre o meio extracelular e intracelular possa ser mantido. O K^+ , a par com o Na^+ , desempenha um papel importante na atividade neuromuscular, no qual tanto o gradiente de concentração extracelular e intracelulares são fatores significantes. Mantém a força iônica intracelular assim como o volume celular e funciona como catião complementar de proteínas intracelulares e outras moléculas. Os valores de referência variam entre os 3,5 e os 5 mmol/L. Hipocaliémia é o nome dado por definição a valores $<3,5$ mmol/L que podem ser provocados por dieta deficiente, perdas gastrointestinais, diuréticos, hiperglicémia (diurese osmótica), alcalose, perda renal, hiperaldosterismo etc. A hipercaliémia, ou seja, valores >5 mmol/L é provocada por excesso de absorção de K^+ , lesões tecidulares, falha renal e hipoaldosterismo (diminuição da secreção de K^+) ou acidose (Burtis *et al.*, 2016).

- Cloretos

Os cloretos assim como o Na^+ está envolvido na manutenção da distribuição da água, pressão osmótica e equilíbrio ácido-base. Os valores de referência variam entre 95-100 mmol/L. Valores baixos de cloretos ou hipoclorémia podem ocorrer quando há situações de alcalose metabólica, para compensar o aumento do bicarbonato (HCO_3^-), quando há perdas a nível gastrointestinal ou doenças renais onde não ocorre a sua reabsorção. Valores elevados de cloretos ou hiperclorémia ocorrem geralmente em situações de acidose metabólica onde há diminuição do HCO_3^- (Burtis *et al.*, 2016).

- Cálcio

O cálcio total no plasma compreende frações ligadas a proteínas, complexadas e ionizadas. Assim, as alterações nas concentrações plasmáticas de proteínas ou no estado do equilíbrio ácido-base afetarão a relação entre o cálcio total e o cálcio ionizado (Marshall *et al.*, 2014).

O cálcio é o catião mais prevalente no nosso organismo, sendo que os ossos e dentes representam 99% da sua existência, enquanto que o restante 1% se encontra distribuído pelo sangue, músculos e tecidos. A sua principal função está relacionada com formação e manutenção da estrutura óssea, além de participar na transmissão de impulsos nervosos, na contração muscular e coagulação sanguínea (Burtis *et al.*, 2016).

No IPO a requisição deste parâmetro tende a ser bastante comum uma vez que se pode encontrar alterado em várias doenças oncológicas.

- **Fósforo**

O fósforo encontra-se amplamente distribuído no organismo tanto na forma orgânica, incorporado em ácidos nucleicos, fosfolípidos ou compostos de alta energia, como sob a forma inorgânica distribuído pela estrutura óssea. A hipofosfatemia, caracterizada pela diminuição dos valores séricos da forma inorgânica do fosforo, é geralmente causada por hiperparatireoidismo, perdas gastrointestinais, má absorção ou doenças tubulares renais. O aumento dos valores do fósforo ou hiperfosfatemia podem estar relacionados com a incapacidade de os rins excretarem fosfato, no caso de insuficiência renal, e em situações de hipoparatiroidismo (Burtis *et al.*, 2016).

Hidratos de Carbono

- **Glicose**

A glicose é a principal fonte de energia primária do nosso organismo. Após a sua absorção é necessário que ocorra o seu metabolismo de acordo com as necessidades do organismo. Quando o organismo está num período de jejum, as hormonas de ação contrária à insulina, como é o caso da glucagina, atuam e inicia-se o processo de glicogenólise e acentua-se a via da gliconeogénese permitindo manter os valores da glicemia normais. Quando há aumento da glicose ocorre a produção de insulina pelas células do pâncreas e esta é assimilada pelas células sendo metabolizada na via glicolítica a piruvato e acetil coenzima A. Numa situação patológica como é o caso de diabetes *mellitus* a via gliconeogénica é continuamente estimulada quer a pessoa coma ou não, porque o organismo não tem ou não produz insulina em quantidades suficientes (Marshall *et al.*, 2014).

Segundo a norma 002/2011 da DGS o diagnóstico clínico da diabetes *mellitus* é feito com base nos seguintes parâmetros:

- a) Glicémia de jejum ≥ 126 mg/dl; ou
- b) Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl; ou
- c) Glicemia ≥ 200 mg/dl às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral com 75g de glicose; ou
- d) HbA1c $\geq 6,5\%$

Embora a diabetes *mellitus* seja a patologia mais associada à hiperglicémia, são também causas deste fenómeno a doença pancreática, endocrinopatias (doenças que levam à produção de hormonas contrárias à insulina) e certos fármacos e compostos químicos. Situações de hipoglicémia ocorrem devido ao aumento de produção de insulina (Hiperinsulinismo), quando existe a prevalência de doença hepática, alcoolismo ou doenças do armazenamento do glicogénio; Doenças malignas, infeções, doenças endócrinas (Burtis *et al.*, 2016).

- **HbA1c**

A HbA1c é a principal fração da hemoglobina glicada e é doseada em sangue total colhido em tudo com EDTA. A glicosilação consiste na ligação da glicose presente no sangue ao N-terminal da β -globulina, varia em função da concentração da glicose a que os eritrócitos estão sujeitos e, portanto, representa um papel de extrema importância no diagnóstico e monitorização do controlo glicémico em pacientes com diabetes *mellitus*. Esta, reflete a glicémia média das últimas 8 a 12 semanas e os resultados expressam-se em % em relação à hemoglobina total (Direcção-Geral da Saúde. Ministério da Saúde, 2011).

Lípidos

Os lípidos plasmáticos, colesterol, triglicéridos, fosfolípidos e vitaminas lipossolúveis circulam na corrente sanguínea incluídos nas lipoproteínas. As diferentes classes destas partículas diferem na percentagem daqueles constituintes.

- **Colesterol Total**

O colesterol é essencial ao organismo uma vez que é componente da estrutura das biomembranas, é precursor das hormonas esteroideas, das vias e dos ácidos biliares. É sintetizado em muitos tecidos, com ênfase no fígado. A maioria do colesterol é formado por síntese enquanto que apenas $\frac{1}{4}$ tem origem na dieta alimentar. Contudo a sua acumulação pode ser nociva e levar a processos de aterosclerose (Burtis *et al.*, 2016).

Como tal, é necessário preceder-se à sua medição para avaliação do risco de doença cardiovascular e para o estudo de dislipidémias.

- **Colesterol HDL**

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol das células de todo o organismo para o fígado. Neste, o colesterol presente é transformado em ácidos biliares que são depois excretados pelas vias biliares. A importância da monitorização clínica do colesterol HDL no soro, prende-se com o facto de que existe

uma correlação entre concentrações baixas deste tipo de lipoproteínas e as doenças cardiovasculares.

- **Colesterol LDL**

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são lipoproteínas que derivam de lipoproteínas com densidade muito baixa (VLDL) ricas em trigliceróis. As LDL são importantes para ceder o colesterol necessário aos tecidos, porém, quando a sua concentração aumenta no sangue ou o seu tempo de permanência neste, resultam num processo de formação de placas ateroscleróticas, daí o colesterol LDL ser comumente designado por “mau colesterol” e a sua determinação ser muito importante na prevenção de doenças cardiovasculares (Burtis et al., 2016).

- **Trigliceróis**

Os trigliceróis têm origem parcial no fígado e a partir da dieta. São constituídos por esteres de álcool-glicerol ligados a 3 ácidos gordos de cadeia longa. As lipoproteínas que apresentam maior quantidade de triglicerídeos são as Quilomicron e as VLDL e estão na origem de distúrbios lipídicos como é o caso da Hiperquilomicronémia ou Hipertrigliceridémia Familiar. A sua determinação é utilizada no diagnóstico e acompanhamento de doentes com este tipo de patologias assim como no caso de doenças cardiovasculares, hepáticas, e diabetes *mellitus*.

Perfil Renal

- **Ureia**

A ureia é o produto final principal do metabolismo do azoto proteico. É sintetizada no ciclo da ureia a partir da amónia, e é excretada maioritariamente pelos rins. Ao longo do tempo tem sido usada como indicador renal, contudo, constatou-se que a Creatinina fornece melhores informações a este respeito. Esta afirmação deve-se ao facto de a Ureia poder ser influenciada por uma ampla variedade de fatores extra renais. Exemplos destes são o aumento da ureia provocado por uma alimentação rica em proteínas ou por uma situação de desidratação. Relativamente ao perfil renal, verificam-se aumentos de ureia no sangue relacionados a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), por obstrução pré renal; necrose tubular, nefrite glomerular ou nefrosclerose ou por obstruções pós renais (Burtis et al., 2016).

- **Creatinina**

A determinação da creatinina e a ureia são os métodos mais utilizados para avaliar a função e desempenho renal. A creatinina é um produto do metabolismo muscular que é gerado constantemente pelo organismo dependendo da massa muscular. Em condições normais é filtrada e excretada pelos rins. Um aumento significativo da creatinina no sangue só se verifica quando já existem lesões graves nos nefrónios sendo a sua determinação pouco adequada para detetar doenças renais em fases iniciais.

- **Clearance de Creatinina**

Um teste mais sensível e que permite uma melhor estimativa da TFG é o teste da clearance da creatinina que se baseia na concentração da mesma na urina, no soro/plasma e no débito urinário.

- **Ácido úrico**

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas. A sua determinação é utilizada no diagnóstico e tratamento de perturbações metabólicas e renais. Como exemplos temos a gota, cálculos renais ou defeitos tubulares e subnutrição.

Perfil hepático

- **Bilirrubina**

A bilirrubina forma-se no sistema reticuloendotelial durante a degradação dos eritrócitos ao fim do seu tempo de vida correspondente a 120 dias. A hemoglobina é constituída pela fração heme que vai ser removida e metabolizada em bilirrubina para posterior transporte para o fígado. Neste, a bilirrubina é conjugada com ácido glucorónico para ser solubilizada e transportada pelos canalículos biliares com o intuito de ser eliminada no aparelho digestivo. Quando existem processos hemolíticos a bilirrubina aumenta rapidamente na corrente sanguínea, uma vez que o fígado não tem capacidade de a metabolizar ao mesmo ritmo que esta é formada. Neste caso, ocorre o aumento da fração não-conjugada da bilirrubina, chamada bilirrubina indireta. Se o problema for a nível hepático ou dos canalículos biliares, como por exemplo por pedras vesiculares, o aumento irá corresponder tanto à bilirrubina indireta como à fração conjugada da bilirrubina ou bilirrubina direta (Burtis *et al.*, 2016).

- Alanina Aminotransferase (ALT)

A ALT é uma enzima com atividade mais elevada no fígado, utilizada em conjunto com outros biomarcadores no diagnóstico de doenças hepáticas. Aumentos séricos desta enzima podem estar associados a situações de cirrose, hepatite, icterícia obstrutiva ou alcoolismo.

- Aspartato aminotransferase (AST)

A AST encontra-se amplamente distribuída pelos tecidos, mais concretamente no tecido hepático, cardíaco, muscular e renal. Assim como a ALT, é utilizada para o diagnóstico de doenças hepatobiliares, contudo, é uma enzima menos específica e que se apresenta aumentada no sangue em períodos de tempo menores.

- Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina está presente em quase todos os órgãos do corpo humano localizando-se nos hepatócitos, rins, placenta, intestino delgado e osteoblastos. O seu aumento verifica-se especialmente na icterícia obstrutiva, porém a sua atividade pode também aumentar na doença óssea como o caso da doença de Paget, hiperparatiroidismo, raquitismo e osteomalícia.

- γ – glutamiltransferase (γ GT)

A γ GT está presente no túbulo renal proximal, fígado, pâncreas e intestino. Esta é uma enzima presente no citoplasma, porém a maior fração encontra-se localizada na membrana celular. Embora o tecido renal contenha maior concentração desta enzima, a γ GT serve como indicador da presença de doenças hepatobiliares embora seja pouco específica. A sua atividade enzimática serve de despistagem ao abuso de álcool (Burtis *et al.*, 2016).

- LDH

A LDH é uma enzima que apresenta uma ampla distribuição tecidual e é libertada em resposta a danos tecidulares. O aumento da atividade desta enzima ocorre em condições clínicas como é o caso do enfarte do miocárdio, hemólise ou doenças pulmonares e musculares. Elevações na atividade de LDH são também observadas em doença hepática (cirrose ou hepatite) porém seu uso clínico para estes parece limitado e pouco ou nada informativo quando utilizado adicionalmente à dosagem das aminotransferases para esse propósito (Burtis *et al.*, 2016).

- Albumina

A albumina é a proteína plasmática mais abundante e geralmente representa um pouco mais do que metade da massa de proteínas do plasma. É produzida no fígado e é o principal

contribuinte para a pressão osmótica no espaço vascular, ajudando a manter os fluidos neste. O aumento desta proteína está geralmente associado a situações de desidratação. A diminuição da albumina, uma vez que é uma proteína produzida no fígado, pode significar doença hepática ou pode ser devido a perda renal, gastrointestinal, inflamação, queimaduras ou provocar edemas (Burtis *et al.*, 2016).

Perfil pancreático

- **Amilase**

Existem dois tipos principais de enzima amilase, a amilase presente na saliva (amilase salivar ou amilase do tipo S) e a amilase produzida no pâncreas (amilase pancreática ou amilase do tipo P). A amilase encontra-se presente em diversos órgãos e tecidos embora a sua concentração se encontre mais elevada nas glândulas salivares. A amilase tipo P é sintetizada no pâncreas sendo exclusiva deste órgão, e é secretada para o trato intestinal pelos ductos pancreáticos. A magnitude do aumento da amilase tipo P não está relacionada com a severidade do envolvimento pancreático, embora quanto maior for o aumento maior a probabilidade de se tratar de pancreatite aguda. A especificidade clínica da amilase é baixa dado que valores aumentados também são encontrados em enfermidades intraabdominais (obstrução intestinal, trauma, gastrite, etc) e em diversas condições extrapancreáticas (abuso alcoólico, fármacos, lesões na glândula salivar, etc) (Burtis *et al.*, 2016).

- **Lípase**

Além da amilase, as lípases pancreáticas são parâmetros são importantes no diagnóstico diferencial do pâncreas. A maioria da atividade da lipase encontrada no soro deriva do pâncreas embora uma parte seja secretada pelas mucosas gástricas e intestinais. É assim como a amilase uma enzima pequena, contudo, apesar de ser filtrada nos rins, é reabsorvida e não é detetável na urina. É uma enzima com elevada especificidade e resposta rápida a danos pancreáticos (Burtis *et al.*, 2016).

Na figura 11 está representada a cinética de libertação no plasma da Lipase e Amilase após uma situação de pancreatite aguda.

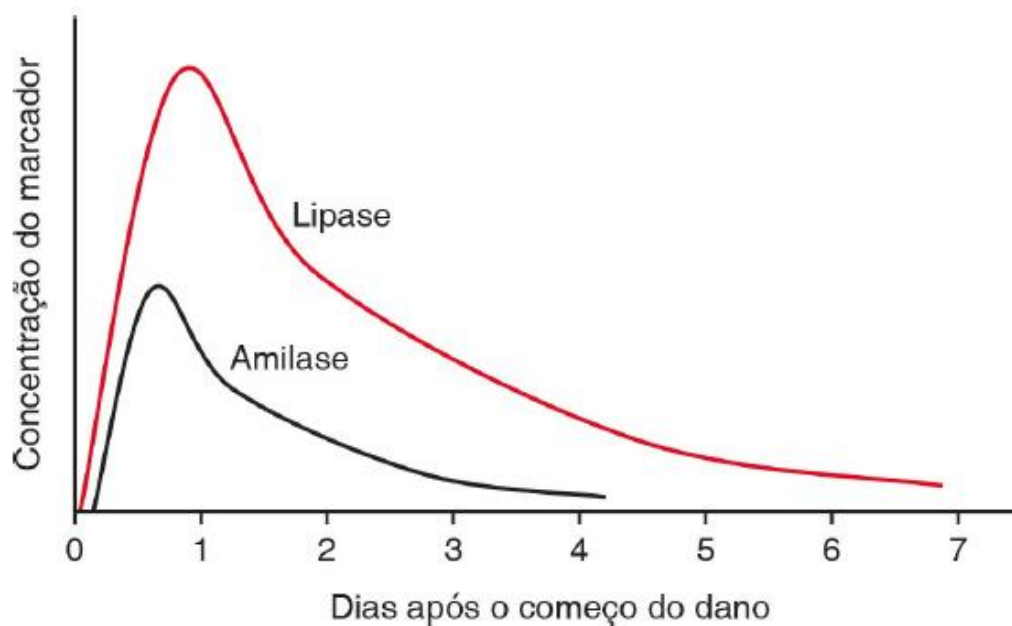


Figura 11: Níveis séricos da amilase e da lipase depois da pancreatite aguda (Adaptado Tietz: fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular 7ed).

Metabolismo do ferro

O ferro está presente na maioria das células do corpo, no plasma e outros fluidos extracelulares. É obtido através da dieta sendo posteriormente distribuído pela hemoglobina e mioglobina, ferritina e hemossiderina (armazenamento), transferrina e apotransferrina (transporte) e pelos tecidos. A sua deficiência ou sobrecarga constituem os principais distúrbios do seu metabolismo. O diagnóstico e acompanhamento destes problemas são feitos através das medições do ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro, ferritina, transferrina e do ferro da medula óssea. Excesso de ferro é característico em doenças como hemocromatose hereditária, anemias com eritropoiese ineficaz e aumento da absorção de ferro ou transfusão sanguínea. A deficiência de ferro ocorre em doenças como as anemias (hemolítica, microcítica, macrocítica), perdas de sangue ou problemas na absorção (Burtis et al., 2016).

Proteínas Totais

O conjunto das proteínas que se encontram no plasma são maioritariamente produzidas no fígado, embora também sejam sintetizadas no baço, medula óssea, nas células plasmáticas e gânglios linfáticos. Quando existe determinada patologia, a concentração de cada proteína apresenta alterações individualmente, assim como a concentração do conjunto destas. Exemplos destas alterações são a Hiperproteinemia que ocorre em casos de doenças como o Mieloma Múltiplo ou desidratação grave. Já a Hipoproteinemia pode ocorrer em situações de

perda de sangue, queimaduras graves ou síndrome nefrótica. No caso de a quantidade de proteínas totais não sofrer nenhuma alteração e esta ocorrer apenas numa fração proteica, podem observar-se casos de cirrose hepática, hepatite aguda, inflamações crónicas, glomerulonefrite etc.

Marcadores de lesão cardíaca

Os biomarcadores de lesão cardíaca são macromoléculas intracelulares dos miócitos cardíacos, que incluem enzimas, proteínas contrácteis e mioglobina. Quando há lesão do miocárdio, a perda da integridade da membrana dos miócitos permite a libertação dessas substâncias para a corrente sanguínea. A avaliação clínica é frequentemente limitada por sintomas atípicos e, não raras vezes, o eletrocardiograma inicial não permite o diagnóstico. É nestes doentes com um quadro clínico pouco claro que o doseamento dos biomarcadores cardíacos assume particular importância.

- **Mioglobina**

A mioglobina é uma hemoproteína de baixa massa molecular que se encontra nas células do musculo esquelético e cardíaco e tem como função o transporte e armazenamento de oxigénio. Quando os miócitos se tornam necróticos, a membrana perde integridade e os seus constituintes libertam-se para o meio extracelular. Desta forma, a mioglobina é um marcador ativo para o diagnóstico precoce do enfarte agudo do miocárdio (EAM). A sua deteção no sangue é possível 1-2 horas imediatamente após à manifestação dos primeiros sintomas. Contudo, uma vez que a mioglobina também se encontra no musculo esquelético não é um marcador cardioespecífico e só é visto como um marcador precoce de exclusão em associação a marcadores mais específicos como a Creatina cinase MB (CK-MB) ou como as Troponinas (Henriques *et al.*, 2006).

- **CK-MB**

A CK-MB é uma das 3 isoenzimas que realizam a atividade da Creatina cinase. Cerca de 30% da atividade da creatina cinase no músculo cardíaco deve-se à CKMB e por esta razão, um aumento desta enzima no plasma, representa indícios de EAM. Este aumento é detetado cerca de 4-6 horas após o início dos sintomas sendo que o valor máximo é atingido às 18 horas.

- **Troponinas**

A troponina é uma proteína estrutural, localizada no filamento fino do aparelho contráctil do músculo esquelético e cardíaco. É constituída por três frações: I) troponina C (TnC), que se

une ao cálcio; 2) troponina I (TnI), molécula inibitória, que previne a contração na ausência do cálcio; 3) troponina T (TnT), que se liga à tropomiosina. Só a TnI e a TnT têm interesse na prática clínica uma vez que se encontram no músculo cardíaco. O facto de estas serem de uma elevada especificidade do tecido cardíaco está na base da sua crescente utilização como marcadores de danos no coração. As concentrações em indivíduos saudáveis são praticamente indetetáveis e a sua libertação ocorre sensivelmente ao fim de 4-8 horas após os primeiros sintomas (Henriques *et al.*, 2006).

Na figura 12 estão representados os picos de libertação dos marcadores cardíacos.

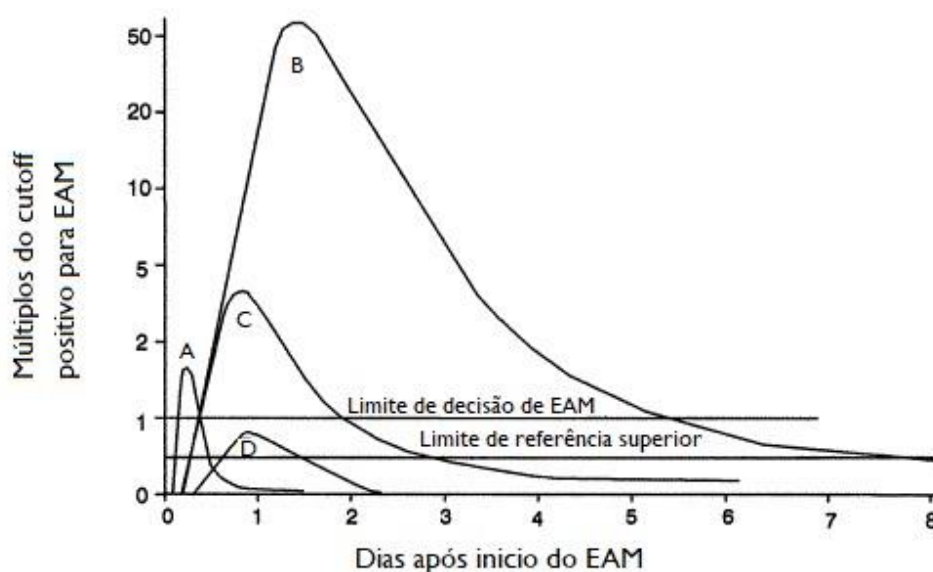


Figura 12: A: Libertação precoce de Mioglobina e Isoformas de CK-MB após EAM; B: Troponina I após EAM; C: CK-MB após EAM; D: Troponinas após Angina Instável (Adaptado de HENRIQUES, Sílvia *et al.* - Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas. Sociedade Portuguesa de Medicina Interna)

Gasometria

A gasometria é a análise mais urgente do setor de Bioquímica Clínica. Esta é solicitada pelo clínico em determinadas circunstâncias que exigem a análise dos gases do sangue, fornecendo informação acerca do equilíbrio ácido base e da oxigenação de pacientes em estado crítico, através da medição do pH, concentração do HCO_3^- , da pressão parcial de CO_2 (pCO_2), pressão parcial de O_2 (pO_2) assim como dos eletrólitos e hemoglobina.

- pH

A manutenção da sua concentração no sangue e consequentemente dos valores de pH, é essencial para a manutenção da homeostasia do organismo. Os valores considerados normais dentro do intervalo de referência para o pH, variam entre 7,35 e 7,45, sendo incompatíveis

com a vida valores abaixo de 6,8 e acima de 7,8. Caso os valores sejam maiores que o intervalo de referência estamos perante uma situação de alcalose. Esta pode ser derivada a problemas respiratórios denominando-se alcalose respiratória, ou a situações metabólicas, sendo neste caso alcalose metabólica. O mesmo se aplica com valores abaixo do normal, existindo Acidose metabólica e Respiratória (Burtis *et al.*, 2016).

- pO_2

O processo de captação do oxigénio a nível pulmonar representa um indicador chave para a avaliação da pO_2 . Esta está dependente da pressão alveolar de oxigénio (influenciada pela altitude, fração de oxigénio inspirado e pCO_2), da ventilação/perfusão e da capacidade de difusão (Higgins, 2012). Níveis acima dos valores do intervalo de referência indicam hiperoxémia da qual podem surgir danos pulmonares devido à toxicidade associada aos radicais livres de O_2 . Níveis de pO_2 abaixo do normal são indicativos de hipóxia e esta, pode originar dispneia, cianose, crepitações pulmonares, hipertensão, sudorese excessiva, confusão e coma de acordo com a sua severidade. São causas comuns de hipoxia: edema pulmonar, pneumonia, tromboembolismo pulmonar, traumas, asma ou intoxicação por gases tóxicos.

- pCO_2

O dióxido de carbono é um produto do metabolismo celular que é transportado pelo sangue sob a forma de HCO_3^- e CO_2 dissolvido ($H^+ + HCO_3^-$). Dado que o sistema respiratório participa na manutenção do equilíbrio ácido base do organismo mediante a eliminação de gases voláteis, como é o caso do CO_2 , a avaliação da pCO_2 é de extrema importância. Esta encontra-se intimamente relacionada com o valor de pH, dado que, na presença de acidose há aumento da frequência respiratória originando a diminuição do CO_2 alveolar e na alcalose ocorre depressão do centro respiratório com conseqüente aumento de CO_2 para contrastar o excesso de HCO_3^- . Em suma, alterações nos valores de pCO_2 , indicam tanto uma possível alteração do estado respiratório como também uma resposta adaptativa para compensar alterações de origem metabólica (Higgins, 2012).

Controlo de Qualidade em Bioquímica Clínica

- **Controlo de Qualidade Externo**

Assim como o setor de Microbiologia, a Bioquímica Clínica recebe 2 amostras bimensais do INSA para análise. Em adição a este programa, o setor participa no programa de controlo externo de qualidade internacional RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*) do qual recebe 1 amostra liofilizada que é posteriormente hidratada no laboratório para análise nos equipamentos.

- **Controlo de Qualidade Interno**

Neste setor o controlo de qualidade interno realiza-se todos os dias antes de se processarem as amostras e sempre que seja considerado necessário. São utilizados controlos enviados pelas “casas” comerciais respetivas de cada equipamento, que são processados como se tratasse de uma amostra normal. Depois do processamento, é necessário verificar se os valores se encontram dentro dos desvios padrão estabelecidos para cada parâmetro. Cada controlo tem entre 2 a 3 níveis de desvio e, caso exista alguma anormalidade, é necessário proceder-se à calibração. Caso esta medida corretiva não surta efeito é necessário verificar se todos os componentes necessários à análise dos parâmetros se encontrem adequados a este mesmo fim, até que tudo volte aos valores “normais”.

Conclusão

A concretização do Mestrado em Análises Clínicas foi para mim, o fechar de uma grande aventura. Ao longo destes dois anos adquiri conhecimentos em diversas áreas que desde cedo me fascinaram. Com muito trabalho, esforço e dedicação foi possível ultrapassar todos os obstáculos e desafios apresentados tanto a nível académico como a nível pessoal.

Embarcar na aventura Erasmus foi uma experiência que, embora não tenha correspondido àquilo que era esperado em termos de Estágio Curricular, me enriqueceu bastante. Cresci, ganhei autonomia e confrontada com uma língua e cultura diferentes fui “obrigada” a desenvolver as relações interpessoais tanto no contexto profissional como fora deste.

Inserida no laboratório de investigação foi possível desenvolver capacidades no que toca ao manuseamento de amostras e sua posterior preparação e ter a perceção da ambição e trabalho árduo necessários para o êxito dos projetos.

Ainda que o período de estágio no SPC do IPO tenha sido mais curto que o normal, fui recebida de braços abertos e rapidamente me inseri na rotina do laboratório de análises clínicas. Na passagem pelos diversos setores, revi e apliquei noções adquiridas ao longo do Mestrado, assim como ganhei aptidões para num futuro próximo exercer um cargo profissional na área das análises clínicas.

Por fim, posso dizer que com o Mestrado em Análises Clínicas e o Estágio Curricular, tenho uma bagagem cheia de ambição e vontade para colocar em prática e enriquecer todo o precioso conhecimento que me foi transmitido e, visto que “o saber não ocupa lugar”, de aprender todos os dias.

Bibliografia

BAXTER-PARKER, Gregory *et al.* - Simultaneous analysis of neopterin, kynurenine and tryptophan by amine-HPLC shows minor oxidative stress from short-term exhaustion exercise. **De Gruyter**. (2019) 21–32.

BROOKS, Geo. F. *et al.* - **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre : AMGH, (2014). ISBN 978-85-8055-335-2.

BURTIS, Carl A. *et al.* - **Tietz: fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, (2016). ISBN 9788535281668.

DICKINSON, Becton - **BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar**. (2013a). [Consult. 9 ago. 2019]. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9103>

DICKINSON, Becton - **BD XLD Agar (Ágar de desoxicolato-lisina-xilose)**. (2013b). [Consult. 9 ago. 2019]. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9086>

DICKINSON, Becton - **BD Hektoen Enteric Agar (HE Agar)**. (2013c). [Consult. 10 ago. 2019]. Disponível em: <http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=9065>

DICKINSON, Becton - **BBL Schaedler Broth with Vitamin K**. (2015). [Consult. 9 ago. 2019]. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22327>

DICKINSON, Becton - **BD BACTEC™**. (2019a). [Consult. 27 jul. 2019]. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/blood-culture/bactec>

DICKINSON, Becton - **BD BBL™ Crystal™ - Sistema de Identificação de Microrganismos Clinicamente Relevantes**. (2019b). [Consult. 12 ago. 2019]. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/identification-and-susceptibility-testing/bbl-crystal-identification-system>

DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE - Diagnóstico da Infecção por *Clostridium difficile* nos Hospitais, Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados e na Comunidade. **Norma Da Direção - Geral Da Saúde**. (2015) 9.

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c. **Norma Da Direção - Geral Da Saúde**. (2011) 10.

FONSECA, Ana Bruschy *et al.* - Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas

em Bacteriologia. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde - Dr. Ricardo Jorge Programa Nacional de Controlo de Infecção.** (2004) 52.

GRABE, M. *et al.* - Guidelines on Urological Infections. **Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare.** . ISSN 23492562. 3:13 (2017) 433–438. doi: 10.18410/jebmh/2016/101.

HENRIQUES, Sílvia *et al.* - Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas. **Sociedade Portuguesa de Medicina Interna.** 13 (2006) 113-125.

HIGGINS, Chris - Why measure blood gases? A three-part introduction for the novice. Part I. **Acutecaretesting.org.** January (2012) 1–9.

IPO COIMBRA - **História do IPO de Coimbra.** (2019). [Consult. 24 jul. 2019]. Disponível em: <https://ipocoimbra.com/historia/>

KHAN, Kaleem J. *et al.* - Clue cells. **Sexually Transmitted Diseases.** 28:2 (2007) 108–109.

MADIGAN, Michael T. *et al.* - **Brock Biology of Microorganisms.** 13. ed. San Francisco : Pearson Education, (2012). ISBN 9780321649638.

MARSHALL, William J. *et al.* - **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.** 3ed. ed. Edinburgh : Churchill Livingstone-Elsevier, (2014). ISBN 9780702054785.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S. - **Microbiologia Médica.** 7. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, (2014). ISBN 978-85-352-7978-8.

NELSON, David L.; COX, Michael M.; LEHNINGER, Albert L. - **Lehninger principles of biochemistry.** New York : W.H. Freeman, (2013). ISBN 9781464109621 1464109621.

SIDRYS, Linas A.; PARTAMIAN, Leon G. - Vitamin A Deficiency. **Archives of Dermatology.** . ISSN 15383652. 115:11 (1979) 1286–1287. doi: 10.1001/archderm.1979.04010110002005.