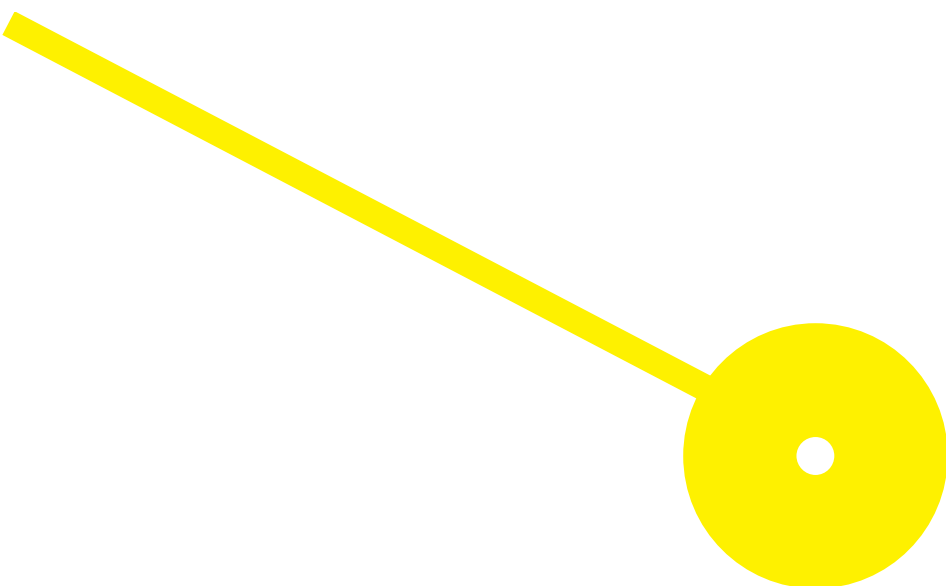




Relatório de Estágio em Análises Clínicas no Laboratórios Médicos de Análises Clínicas – Avelab

Ana Miguel Rodrigues Mota

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**Relatório de Estágio em Análises Clínicas no Laboratórios Médicos de Análises Clínicas –
Avelab**

Autor

Ana Miguel Rodrigues Mota

Orientadores

Farmacêutico Especialista/António Ferreira Neves/ Laboratórios Médicos de Análises Clínicas –
Avelab

PhD/Mónica Vieira/ ESS |IPP

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo de Especialização em **Bioquímica Clínica e Metabólica** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

O presente relatório apresentado apenas foi exequível graças à colaboração de várias pessoas, por isso, a todas elas, quero manifestar os meus agradecimentos.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Dr. António Ferreira Neves por me ter acolhido no Laboratório Avelab e a todos os seus membros integrantes e colaboradores, pelo acolhimento desde o início e por ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Samuel Figueiredo, Inês Raposo, Dr^a Miriam Rocha e Gizela Silva pela orientação, por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e apoio prestado ao longo do estágio.

À Prof. Mónica Vieira pela disponibilidade e orientação prestada na elaboração deste trabalho, mas, também, pela transmissão de conhecimento ao longo do meu percurso pela ESS.

Aos meus pais e família chegada pelo orgulho e encorajamento demonstrado, por possibilitarem realizar todo o meu percurso académico e pelo apoio incondicional, criando assim, sempre, as melhores condições para o meu sucesso.

Ao meu namorado por sempre me ter apoiado, pela paciência e compreensão demonstrada para comigo e pela ajuda prestada durante a realização do estágio e relatório de estágio mesmo que, para isso, tenha tido de abdicar de alguns fins de semana e feriados. E claro pelo carinho e amor.

Aos meus amigos pelo apoio e compreensão que sempre demonstraram e também, pelos momentos de companhia vividos ao longo destes anos de formação académica.

Para finalizar, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o sucesso da minha formação académica.

Resumo

O presente relatório reporta o trabalho desenvolvido durante o estágio curricular do Mestrado em Bioquímica em Saúde, área de especialização em Bioquímica Clínica e Metabólica, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, realizado no Laboratórios Médicos de Análises Clínicas- Avelab.

O objetivo da realização do estágio passa por desenvolver as capacidades laboratoriais em contexto real de trabalho, bem como vivenciar a rotina de um laboratório e, ainda, percorrer algumas áreas das Análises Clínicas, nomeadamente, a Microbiologia, a Bioquímica e a Imunologia.

Neste relatório de estágio descrevem-se o funcionamento das áreas clínicas do laboratório, as atividades realizadas, o processamento laboratorial, referindo ainda os equipamentos e metodologias utilizadas e, ainda, a apresentação de alguns casos clínicos observados.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Bioquímica; Imunologia; Microbiologia; Avelab

Abstract

The present report describes the work developed during the curricular internship of the Master's Degree in Biochemistry in Health, an area of specialization in Clinical and Metabolic Biochemistry, at the Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, performed at the Laboratórios Médicos de Análises Clínicas – Avelab.

The objective of carrying out the internship is to develop laboratory skills in a real work context, as well as experience the routine of a laboratory and also go through some areas of Clinical Analysis, namely Microbiology, Biochemistry and Immunology.

This internship report describes the functioning of the laboratory's clinical areas, the activities carried out, laboratory processing, also mentioning the equipment and methodologies used and also the presentation of some clinical cases observed.

Keywords: Clinical Analysis; Biochemistry; Immunology; Microbiology; Avelab

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Objetivos do estágio.....	2
2.	O Laboratório de estágio- Avelab.....	3
2.1.	Receção de amostras.....	3
2.2.	Processamento de Amostras.....	4
2.2.1.	Fase pré-analítica.....	4
2.2.2.	Fase analítica.....	5
2.2.3.	Fase pós-analítica.....	5
3.	Controlo de Qualidade.....	7
3.1.	Controlo de Qualidade Interno.....	7
3.2.	Controlo de Qualidade Externo.....	7
4.	Triagem.....	8
4.1.	Amostras de sangue.....	8
4.2.	Amostras de urina.....	9
4.3.	Amostras de fezes.....	9
4.4.	Amostras rejeitadas.....	10
5.	Análise Bioquímica.....	11
5.1.	Metodologias Instrumentais.....	12
5.1.1.	Potenciometria.....	12
5.1.2.	Fotometria.....	13
5.2.	Parâmetros Bioquímicos.....	13
5.2.1.	Metabolismo dos lípidos.....	13
5.2.2.	Metabolismo ósseo mineral.....	15
5.2.3.	Ionograma.....	16
5.2.4.	Função renal.....	17
5.2.5.	Função hepato-biliar.....	19
5.2.6.	Metabolismo do ferro.....	21
5.2.7.	Metabolismo Hidratos de carbono.....	21
5.2.8.	Proteínas.....	22
5.3.	Casos Clínicos.....	23

5.4.	Validação Médica no setor da Bioquímica.....	25
6.	Análise Imunológica.....	26
6.1.	Ensaio Imunológicos.....	27
6.1.1.	Ensaio Imunológico competitivo.....	27
6.1.2.	Ensaio Imunológico não competitivo (Sandwich).....	28
6.2.	Metodologias Instrumentais.....	28
6.2.1.	Quimioluminescência.....	28
6.3.	Parâmetros Imunológicos.....	28
6.3.1.	Marcadores Tumorais.....	28
6.3.2.	Citomegalovírus.....	31
6.3.3.	Rubéola.....	32
6.3.4.	Toxoplasmose.....	34
6.3.5.	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	35
6.4.	Casos Clínicos.....	36
6.5.	Validação médica no setor da Imunologia.....	39
7.	Análise Microbiológica.....	40
7.1.	Triagem Microbiologia.....	40
7.2.	Equipamentos Automatizados.....	41
7.2.1.	Unamax e Sedimax.....	41
7.2.2.	Vitek 2 Compact.....	42
7.3.	Métodos de Coloração.....	44
7.3.1.	Coloração de Gram.....	44
7.3.2.	Coloração de Ziehl-Neelsen.....	45
7.3.3.	Coloração de Azul de Lactofenol.....	46
7.4.	Meios de Cultura.....	46
7.4.1.	Características dos meios utilizados no Laboratório Avelab.....	47
7.5.	Provas de Identificação Bacteriana.....	48
7.5.1.	Provas bioquímicas realizadas no Laboratório Avelab.....	48
7.6.	Método de Difusão em Disco.....	50
7.7.	Principais Produtos Biológicos do Laboratório.....	50
7.7.1.	Urina.....	51

7.7.2. Fezes.....	54
7.7.3. Exsudados Vaginais	55
7.8. Validação Médica no Setor Microbiologia.....	57
8. Conclusão.....	58
Referências Bibliográficas.....	59

Índice de Abreviaturas, Acrónimos, Sinais

Ac – Anticorpo

Ac Anti-CMV – Anticorpo contra o Citomegalovírus

Ac Anti-HIV – Anticorpo contra o Vírus da Imunodeficiência Humana

Ac Anti-rubéola – Anticorpo contra o Vírus da Rubéola

Ac Anti-toxoplasma – Anticorpo contra o *Toxoplasma gondii*

Ag – Antigénio

ALP – Fosfatase Alcalina

ALT/GTP – Alanina Aminotransferase

ANA – Anticorpos Anti-nucleares

AST/GOT – Aspartato Aminotransferase

ATCC – *American Type Culture Collection*

BAAR – Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

BMP – Bacteriológico, Micológico e Parasitológico

CA 125 – Antigénio Carbohidratado 125

CA 19-9 – Antigénio Hidrocarbonado 19-9

CEA – Antigénio Carcinoembrionário

Cl⁻ – Cloro

CLED – Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos

CMV – Citomegalovírus

CQ – Controlo Qualidade

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo Qualidade Interno

DGS – Direção Geral de Saúde

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

GGT – Gama-glutamilttransferase

HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

HIV-2 – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2

ICT – Tecnologia de Chip Integrado

Ig – Imunoglobulina

ITU – Infecção do Trato Urinário

K⁺ – Potássio

LC – Laboratório Central

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

Na⁺ – Sódio

PSA – Antígeno Específico da Próstata

PVX – Gelose de Chocolate

RIQAS – *Randox Internacional Quality Assessment Scheme*

RNA – Ácido Ribonucleico

Rpm – Rotações por minuto

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SS – Salmonella-Shigella Agar

TPHA – *Treponema Pallidum Hemagglutination*

TSA – Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

UK NEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VDRL – *Veneral Disease Research Laboratory*

Índice de Tabelas

Tabela 1: Tipologia dos tubos de armazenamento de sangue venoso.....	9
Tabela 2: Interpretação e descrição dos resultados do ionograma.....	17
Tabela 3: Resultados clínicos do caso 1 da Bioquímica.....	24
Tabela 4: Resultados clínicos do caso 2 da Bioquímica.....	24
Tabela 5: Interpretação dos resultados para pesquisa de Ac anti-CMV.....	32
Tabela 6: Interpretação dos resultados para pesquisa de Ac anti-rubéola.....	33
Tabela 7: Interpretação dos resultados para pesquisa de Ac anti-toxoplasma.....	35
Tabela 8: Resultados clínicos do caso 1 da Imunologia.....	37
Tabela 9: Resultados clínicos do caso 2 da Imunologia.....	38
Tabela 10: Resultados clínicos do caso 3 da Imunologia.....	38
Tabela 11: Cartas de identificação e de TSA utilizadas no Laboratório Avelab.....	44

Índice de Figuras

Figura 1: Exemplo de um código alfanumérico atribuído a cada utente no laboratório Avelab.....	4
Figura 2: Imagens retiradas no laboratório Avelab de amostras de soro hemolisado (a) e lipémico (b), respetivamente.....	10
Figura 3: Equipamento Alinity ci-series.....	12
Figura 4: Normas para o diagnóstico laboratorial da infeção por HIV.....	36
Figura 5: Análises requeridas com os setores a que se destina.	41
Figura 6: Equipamento UNAMAX	42
Figura 7: Equipamento sediMAX conTRUST	42
Figura 8: Equipamento Vitek 2 Compact)	43
Figura 9: Equipamento AeroSpray® Gram Slide Stainer / Cytocentrifuge	45
Figura 10: Observação microscópica do sedimento urinário.....	52
Figura 11: Visualização microscópica da coloração de Gram	53
Figura 12: Colónias E. coli em meio de CHROMagar Orientation.....	53
Figura 13: Imagem retirada do Laboratório Avelab de Quistos de Entamoeba coli.....	55
Figura 14: Coloração de Gram de um BPM vaginal no laboratório Avelab.....	57

1. Introdução

Antigamente, a identificação de uma determinada patologia era baseada apenas em sinais observados pelo médico e pela interpretação dos sintomas. Desta forma, poderiam existir erros associados ao diagnóstico e, conseqüentemente ao tratamento, uma vez que não eram realizados exames médicos. Deste modo, a ciência tem vindo a desenvolver-se na área das Análises Clínicas de modo a existir mais exatidão no diagnóstico, tratamento e monitorização. Assim, a fim de ajudar no diagnóstico clínico é muito comum a requisição da avaliação de parâmetros ao nível da Bioquímica, Imunologia, Hematologia e/ou Microbiologia.

A evolução da ciência permitiu que os laboratórios de análises clínicas se tornassem cada vez mais automatizados, sendo possível processar um maior número de amostras num curto espaço de tempo e obter resultados de forma mais rápida e exata. Deste modo, as análises clínicas tornaram-se uma importante ferramenta de diagnóstico, bem como de monitorização da terapêutica. No entanto, existe a necessidade de os profissionais de diagnóstico e terapêutica serem exigentes, tanto a nível prático como a nível teórico, uma vez que a qualidade de diagnóstico, monitorização da patologia e da terapêutica depende dos mesmos. (1)

As análises clínicas têm um papel fundamental no meio de diagnóstico complementar uma vez que, através da recolha de materiais biológicos como urina, sangue, fezes, saliva ou outros materiais, permitem diagnosticar anomalias, patologias ou doenças de maior ou menor gravidade, contribuindo, ainda, para a sua prevenção e deteção precoce. Aquando de uma deteção precoce, há um benefício para o utente, bem como a diminuição do custo do tratamento. As análises sanguíneas são o exame mais comum nos *check-ups* de rotina prescritos pelo médico que, posteriormente, são realizados e interpretados pelos técnicos e especialistas do Laboratório.

De modo a colocar em prática toda a formação teórica e prática do Mestrado de Bioquímica em Saúde- Área de Especialização em Bioquímica Clínica e Metabólica, realizou-se um estágio curricular num laboratório que reúne todas as condições necessárias à aprendizagem e consolidação de conhecimentos anteriormente adquiridos. O estágio desenvolveu-se no Laboratórios Médicos de Análises Clínicas- Avelab, sediado em Aveiro, onde foi proporcionada a oportunidade de estar presente e participar em todo o processo analítico, desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica.

Durante o estágio, houve a possibilidade de integrar algumas das áreas do laboratório, tais como, a Bioquímica, a Imunologia e a Microbiologia, sendo estas as áreas abordadas no presente relatório.

1.1. Objetivos do estágio

Inicialmente, realizou-se um planeamento das 720 horas totais a estagiar nos diversos setores, nomeadamente no setor da Bioquímica, da Imunologia e da Microbiologia, assim como a integração nos mesmos e em todo o serviço laboratorial.

No decorrer do estágio, foram apresentados minuciosamente, todos os setores, bem como a sua organização e funcionamento, com o objetivo de fazer um acompanhamento de todo o processamento laboratorial, desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica.

No entanto, houve mais contato com a fase analítica. Durante esta fase pretendeu-se, realizar o acompanhamento de diferentes etapas e procedimentos que são comuns nos setores da Bioquímica e da Imunologia, tais como a efetuar a manutenção diária dos equipamentos; preparar os reagentes, soluções de controlo e calibradores; programar amostras, soluções de controlo e calibradores; garantir a qualidade através da avaliação do Controlo de Qualidade Interno (CQI) e avaliação externa através do Controlo de Qualidade Externo (CQE) e, ainda, de adquirir conhecimentos aprofundados dos equipamentos e metodologias analíticas dos diferentes setores.

De salientar que este estudo foi submetido à Comissão de Ética da Escola Superior de Saúde, tendo o processo o número CE0076E.

2. O Laboratório de estágio- Avelab

O Laboratório Médico de Análises Clínicas-Avelab foi criado em 1956, e está sediado na Rua Cerâmica do Vouga, nº13, 3800-011 em Aveiro. É considerado um dos laboratórios mais experientes em análises clínicas devido à sua qualidade científica, à sua alta tecnologia de diagnóstico, mas também, pela sua experiência no mercado. Conta com cerca de 94 postos de colheitas entre as regiões Norte e Centro de Portugal.

A direção do laboratório é constituída por especialistas em análises clínicas nomeadamente pelo Dr. Américo Freitas (Diretor Clínico), Dra. Teresa Raposo (Médica Patologista) e Dr. António Ferreira Neves (Farmacêutico Especialista).

O laboratório dispõe de um sistema de gestão de qualidade, de acordo com a norma ISO 9001, conferindo, assim, um rigor e controlo de todos os processos que realiza nos seus diferentes setores (Bioquímica, Imunologia, Microbiologia, Biologia Molecular e Hematologia).

O Laboratório Central (LC) funciona de segunda a sexta desde as 7h30 às 19h00, e, aos sábados, das 8h00 às 13h00. Tanto o LC como os diversos postos de colheita recebem, em média, um total de aproximadamente 800 utentes diários.

Todos os setores do laboratório são automatizados, à exceção do setor da Microbiologia, pelo que o laboratório tem vindo a procurar automatizar cada vez mais o fluxo de trabalho, permitindo aumentar a capacidade de resposta no processamento de amostras e eliminar alguns erros humanos.

2.1. Receção de amostras

Após serem colhidas, as amostras são acondicionadas para serem transportadas em arcas refrigeradas para o LC. No LC, as amostras são processadas rapidamente, de forma a evitar a deterioração de analitos. Para isso, contribui o facto de todos os setores estarem equipados com vários aparelhos automatizados, permitindo uma maior rapidez no processamento das amostras.

O laboratório possui ainda um sistema informático que permite rastrear todas as amostras que entram no laboratório para serem analisadas, através de uma etiqueta com código de barras. Esta etiqueta possui também um código alfanumérico do tubo do utente, com o seu respetivo código de barras, o nome do utente e a data em que a colheita foi realizada. O sistema informático encontra-se ligado a todos os aparelhos automatizados e permite controlar o processo analítico desde a entrada da requisição médica até à emissão de resultados.

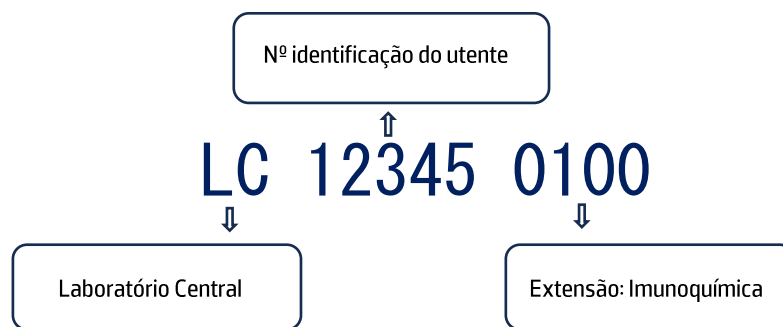


Figura 1: Exemplo de um código alfanumérico atribuído a cada utente no laboratório Avelab

2.2. Processamento de Amostras

O processo de análise de uma amostra vai desde a requisição médica até à emissão do boletim. Deste modo, durante o processamento podem ocorrer erros nos testes uma vez que, nenhum teste ou dispositivo é infalível. (2)

O processo analítico pode ser dividido em três fases: a fase pré-analítica, a fase analítica e a fase pós-analítica. Atualmente, as fases pré-analítica e pós-analítica são aquelas onde ocorre a maioria dos erros associados à análise laboratorial. (3) Por este motivo, é necessário que haja um rigor nas diferentes fases do processo analítico, de forma a garantir um maior controlo e uma menor ocorrência de erros, assim como assegurar a qualidade dos resultados do laboratório.

De notar que todos os procedimentos realizados no laboratório Avelab seguem as normas da Direção Geral de Saúde (DGS).

2.2.1. Fase pré-analítica

Na fase pré-analítica é onde ocorrem a maioria dos erros durante o processamento laboratorial. A elevada frequência de erros deve-se à má preparação do utente como por exemplo, a ausência de jejum, a toma de medicação, as alterações hormonais fisiológicas, o tabagismo, o ciclo circadiano, etc. Além dos erros relativos ao utente, também se pode verificar o erro por parte do colaborador que insere os dados da prescrição no sistema informático. Por exemplo, este pode efetuar o pedido de teste errado ou, também, identificar incorretamente o utente. Além disto, várias situações durante o transporte alteram a qualidade da amostra. Desta forma, o transporte deve ser feito o mais rapidamente possível para o local de processamento, para que se possa

garantir a preservação dos analitos, alterações de temperatura das amostras e o contacto das células sanguíneas.

Durante o estágio que decorreu no laboratório Avelab foi possível verificar que havia o cuidado de informar o utente acerca do modo de colheita dos respetivos produtos biológicos e se havia necessidade de jejum. Além do utente ser instruído sobre o procedimento da colheita de amostras eram fornecidos os recipientes necessários para que este pudesse colher e transportar as amostras até ao laboratório. Ao longo do período de estágio, verificou-se que a ocorrência de erros era mínima, dada a experiência de todos os profissionais de saúde e à existência de uma padronização dos procedimentos realizados.

2.2.2. Fase analítica

A fase analítica é onde existe menor suscetibilidade de ocorrência de erros. Os erros mais frequentes nesta fase são o mau funcionamento dos equipamentos, falhas não detetadas na calibração e controlo dos reagentes, má preparação dos reagentes, diluições e pipetagens inadequadas, entre outros. (4)

De forma a minimizar os erros cometidos, no laboratório Avelab todos os equipamentos são calibrados e controlados diariamente para, assim, os reagentes não conterem erros que se possam expressar nos resultados, adulterando-os.

2.2.3. Fase pós-analítica

A fase pós-analítica diz respeito à validação dos resultados laboratoriais por parte dos especialistas e, posteriormente, os mesmos são enviados para o utente para que o médico possa avaliar e interpretar os resultados obtidos. Os erros mais comuns nesta fase são a falha do software, a validação incorreta de resultados, a entrega de dados inadequada e incompleta e a falha de resultados, ou seja, falta de concordância entre parâmetros. (4)

De forma a minimizar os erros, primeiramente faz-se uma validação por parte do técnico do setor onde se efetuou a análise e, posteriormente, uma segunda validação pelos especialistas.

No laboratório Avelab, os relatórios críticos são gerados através de um alerta, uma vez que não são validados através do sistema de validação automática, tendo o técnico do setor analisar os desvios referentes aos parâmetros padrões. Desta forma, os resultados são imediatamente

transmitidos ao utente ou ao médico para que se possam tomar medidas o mais rapidamente possível.

3. Controlo de Qualidade

Os laboratórios de análises clínicas têm como objetivo assegurar testes precisos, de alta qualidade e clinicamente revelantes, em todas as fases do ciclo analítico, desde a fase pré-analítica até à pós-analítica. Desta forma, o controlo de qualidade (CQ) é um parâmetro laboratorial que confere maior fiabilidade do procedimento de testes precisos. (5)

3.1. Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno (CQI) tem como objetivo analisar diariamente amostras de controlo com analitos de valores conhecidos, permitindo assim a avaliação e precisão dos ensaios realizados. (6)

No laboratório Avelab, os equipamentos são calibrados e controlados diariamente, sempre que há uma alteração do número do lote do reagente ou ainda na troca de reagente. Os equipamentos utilizam a Regra de Westgard, isto é, intervalos que definem desvios padrões aceitáveis nos resultados das análises clínicas a partir de um analito de valor já conhecido. Se o resultado se afastar da margem do desvio definido, o equipamento precisa de ser reajustado visto que os resultados não são fiáveis. Por vezes uma nova calibração é suficiente, no entanto, em algumas ocasiões é necessária uma manutenção crítica por parte do fornecedor.

3.2. Controlo de Qualidade Externo

O controlo de qualidade externo (CQE) é realizado por uma entidade externa. A avaliação da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório é efetuada por comparação de resultados dos laboratórios participantes que utilizam os mesmos métodos. O CQE tem como objetivo determinar e ajustar a exatidão dos métodos utilizados. (6) A amostra externa enviada tem características desconhecidas, no entanto é processada da mesma forma que as amostras em laboratório.

No laboratório Avelab, o CQE é realizado por duas entidades avaliadoras, o UK NEQAS "*United Kingdom National External Quality Assessment Service*" e pelo RIQAS "*Randox Internacional Quality Assessment Scheme*". Aquando de resultados incorretos, o Laboratório é imediatamente notificado para que se faça a correção dos erros.

4. Triagem

A triagem é crucial para verificar se todos os produtos que chegam ao laboratório estão bem identificados, se contêm volume suficiente, se existem soros hemolisados ou coagulados. Verifica-se, também, se há erro de etiquetagem.

Todos os soros são centrifugados na sala de triagem e, posteriormente são colocados em leitura no equipamento *Indexor Marksense*. Neste equipamento é possível rastrear as amostras, mas também todas as análises associadas ao código de barras. Desta forma, retiram-se as alíquotas para análises a realizar no Avelab como *Treponema Pallidum Hemagglutination* (TPHA), Veneral Disease Research Laboratory (VDRL), anticorpos anti-nucleares (ANA) e alíquotas realizadas em dois laboratórios situados em Barcelona - Ambar e Cerba. Para estes dois laboratórios são realizadas análises como catecolaminas, 1,25-dihidroxi-vitamina D, entre outras. Estas amostras são bem acondicionadas e conservadas durante o transporte para que não haja contaminação nem deterioração das mesmas.

4.1. Amostras de sangue

Dependendo da análise a realizar, existem diferentes tubos com aditivos para armazenamento de sangue venoso. Estes tubos apresentam tampas com diferentes cores, de forma a serem facilmente distinguidos.

Na triagem são vistos os variados tubos para armazenar sangue venoso e, posteriormente selecionados para os setores correspondentes, conforme mostra a Tabela 1.

No laboratório Avelab são utilizados os tubos BD Vacutainer® SST® Advance® para as análises serológicas, bioquímicas, imunológicas, e apresentam tampa amarela. No caso de uma colheita difícil, por exemplo, em pacientes com veias muito finas, veias complicadas de encontrar, os tubos apresentam tampa vermelha. A parede interna do tubo de tampa amarela contém partículas de sílica, com a finalidade de iniciar a cascata de coagulação quando o sangue entra em contacto com as paredes do mesmo. Estes contêm um gel acrílico semissólido que separa assim, os glóbulos vermelhos do soro após a sua centrifugação, permitindo a estabilidade da amostra. Uma vez que os glóbulos vermelhos são mais densos migram para o fundo do tubo, enquanto o gel é mais denso do que o soro, ficando este último na parte de cima. (7)

O tubo de tampa azul-claro, com citrato de sódio é usado para testes de coagulação do sangue.

O tubo de tampa roxa contém ácido etilenodiamino tetra-acético, conhecido como EDTA, isto é, o anticoagulante usado para análises de hemogramas, uma vez que este preserva a morfologia celular.

Tabela 1: Tipologia dos tubos de armazenamento de sangue venoso

Cor da Tampa	Amostra	Composição	Setor
Amarelo ou Vermelho	Soro	Gel separador de coágulo	Bioquímica e Imunologia
Azul Claro	Sangue total ou plasma	Citrato de Sódio	Coagulação
Lilás	Sangue total ou plasma	EDTA	Hematologia

4.2. Amostras de urina

Uma colheita de urina adequada para realizar exame bacteriológico deve ser efetuada com a primeira urina da manhã e do jato intermédio, uma vez que a uretra é colonizada por uma variedade de bactérias, sendo que o primeiro jato deve ser sempre descartado. Contudo, também pode ocorrer a multiplicação dos agentes patogénicos colonizadores do trato urinário nas amostras, pelo que é fundamental o transporte das amostras em tempo adequado. Em caso de atraso no transporte, as amostras devem ser refrigeradas, de maneira que as contagens bacterianas permaneçam constantes até ao processamento da amostra de urina. (8)

No caso do exame sumário de urina, a colheita pode ser efetuada ocasionalmente e não tem obrigatoriedade de ser a primeira urina da manhã.

Tanto no exame bacteriológico de urina como no exame sumário de urina, a colheita deve ser feita com os devidos cuidados de higiene antes da micção, para um frasco de colheita estéril.

4.3. Amostras de fezes

As amostras de fezes devem de ser colhidas numa porção pequena para um copo estéril com tampa. Também carecem de ser entregues o mais rápido possível no laboratório devido ao metabolismo bacteriano que causa acidez nas fezes, sendo tóxico para alguns organismos. (8)

4.4. Amostras rejeitadas

Algumas amostras podem ser rejeitadas *a priori*, como por exemplo, amostras com volume insuficiente, amostras coaguladas, amostras hemolisadas, lipémicas e ictéricas.

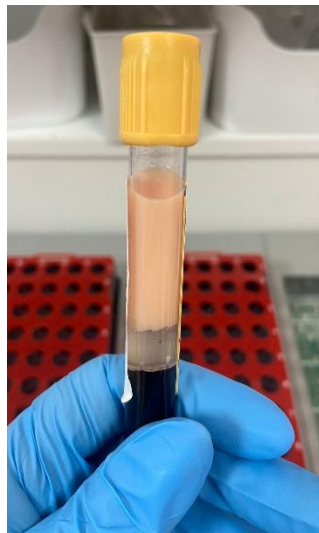
A hemólise é um dos erros pré-analíticos mais comuns, isto é a rutura da membrana dos glóbulos vermelhos que, conseqüentemente, liberta o seu conteúdo para o soro. Após a amostra ser centrifugada fica com uma cor avermelhada devido à libertação da hemoglobina do interior do glóbulo vermelho. A intensidade da cor é proporcional ao grau de hemólise ocorrido.

A amostra lipémica é aquela que acusa um excesso de lípidos na corrente sanguínea, sendo o soro turvo ou leitoso.

Na figura 2 apresenta-se uma amostra hemolisada e uma lipémica. Estes dois tipos de amostras influenciam as medições espectrofotométricas e, por isso, tem de ser rejeitadas.



(a)



(b)

Figura 2: Imagens retiradas no laboratório Avelab de amostras de soro hemolisado (a) e lipémico (b), respetivamente.

5. Análise Bioquímica

A Bioquímica Clínica é uma área multidisciplinar com o objetivo de determinar parâmetros bioquímicos e a sua utilização no diagnóstico, tratamento, monitorização e prevenção da doença. No setor da bioquímica o equipamento automatizado utilizado é o Alinity ci-series, do fabricante Abbott. A figura 3 representa ilustrativamente, este equipamento.

Este equipamento integra dois módulos, a química clínica (sistema Alinity c) e o imunoensaio (sistema Alinity i). Pode analisar amostras de soro, plasma e urina, e tem a capacidade para processar até 300 amostras em simultâneo.

O sistema Alinity c é um analisador de química clínica automatizado com elétrodos seletivos a iões em tecnologia de chip integrado (ICT) para eletrólitos. (9)

A manutenção diária do equipamento realiza-se tanto no módulo da química como no módulo da imunologia. Quanto à manutenção semanal, esta é realizada por um técnico do laboratório quando o equipamento assim o exige, através de um alerta. Já a manutenção trimestral é visualizada da mesma forma que a semanal, com a exceção de quem a realiza, visto ter de ser um técnico da empresa do equipamento, pois requer uma intervenção mais minuciosa e precisa.

Diariamente, os reagentes são colocados e, de seguida, é realizada a calibração e o respetivo controlo. Também é efetuada a calibração em dois dos três níveis (baixo, médio e alto) do ionograma tanto no soro como na urina e os controlos gerais tanto na química como na imunologia.

A avaliação da qualidade dos testes laboratoriais é realizada através de cartas de controlo que são analisadas pelas regras de Westgard, isto é, intervalos de valores de desvios padrões aceitáveis nos resultados das análises clínicas, a partir de um analito de valor já conhecido. Assim, se os valores se encontrarem fora dos limites de -3 ou $+3$ desvio padrão é necessário proceder a uma reavaliação de modo a melhorar a qualidade e precisão dos testes laboratoriais. Desta forma, deve-se realizar novo controlo, nova calibração e mudança de reagente.

Neste equipamento é possível analisar vários parâmetros como o ionograma (potássio, sódio e cloro), colesterol, glicose, proteínas totais, creatinina, marcadores cardíacos e perfis lipídicos, renais, endócrinos, hepáticos e pancreáticos.

No laboratório Avelab, o setor da Imunoquímica é composto por dois Alinity ci-series onde são feitas as análises bioquímicas e imunológicas. Estes equipamentos trabalham em espelho no módulo da bioquímica, ou seja, existem todos os testes em ambos os equipamentos. Já no módulo da imunologia existem diferentes testes nos dois aparelhos.



Figura 3: Equipamento Alinity ci-series. (Figura adaptada de <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/alinity.html>)

5.1. Metodologias Instrumentais

5.1.1. Potenciometria

A potenciometria baseia-se na medição do potencial de um eletrodo indicador em relação a um eletrodo de referência. Este potencial depende das atividades das espécies iônicas que entram nas reações redox (de oxidação-redução) correspondentes e é expresso através da equação de Nernst. (10)

Equação de Nernst:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \log Q$$

Onde, E= Potencial em condições não-padrão;

E⁰= Potencial em condições padrão;

T= Temperatura em graus Kelvin (298 K é a mais usada);

R= Constante dos gases perfeitos, 8,314 J K⁻¹ mol⁻¹;

n= Número de elétrons envolvidos;

F= Constante de Faraday, 96485 C mol⁻¹;

Q= Quociente de reação, representa a relação entre as espécies químicas envolvidas.

5.1.2. Fotometria

A fotometria mede a quantidade de um analito numa solução de amostra com base na luz absorvida. É uma análise quantitativa usada em laboratório para determinar as quantidades de compostos inorgânicos e orgânicos em soluções.

A fotometria é definida como uma medida da intensidade da luz a um determinado comprimento de onda e baseia-se na capacidade de absorção da radiação. Nos métodos espectrofotométricos, a amostra, contém o analito que se pretende determinar e é misturada com um reagente líquido. Esta reação (amostra em conjunto com o reagente) produz uma alteração na absorvância e consequente formação de um complexo corado. O fotodetector deteta a alteração na absorvância que é proporcional à concentração do analito presente na amostra em estudo. (11)

5.2. Parâmetros Bioquímicos

Neste subcapítulo serão abordados alguns dos parâmetros bioquímicos avaliados no setor da bioquímica do Avelab com mais frequência e com os quais contactei frequentemente.

5.2.1. Metabolismo dos lípidos

Os lípidos são sintetizados no fígado e no intestino, contudo são transportados no plasma através de macromoléculas, as lipoproteínas.

Alterações dos valores das lipoproteínas estão associadas a patologias designadas por dislipidemias, que se caracterizam por aumento dos valores de colesterol e triglicerídeos, ou a diminuição dos valores de lipoproteínas de alta densidade (HDL).

O doseamento dos lípidos e das lipoproteínas tem um papel importante, uma vez que são indicadores de risco de doença cardiovascular. Desta forma, é importante descartar possíveis causas de alterações nos parâmetros lipídicos, antes de se tratar de fatores de risco cardiovascular. Por esta razão é tao importante o diagnóstico e monitorização. (12)

Triglicerídeos

Os triglicerídeos são uma família de lípidos que são produzidos no fígado, por via endógena, ou absorvidas a partir da dieta, por via exógena, a partir de ácidos gordos e hidratos de carbono. Desta maneira, são uma fonte e reserva energética para o organismo.

A quantificação de triglicérides é importante no diagnóstico e tratamento de hiperlipidémias, uma vez que um aumento sérico de triglicérides significa também um aumento sérico de lipoproteínas. Este aumento está associado a patologias que podem ser genéticas ou secundárias. Indivíduos hipertensos, obesos e diabéticos apresentam maior risco relativamente aos que não sofrem destas doenças. (12)

Colesterol total

O colesterol total evidencia a totalidade de lipoproteínas presentes na corrente sanguínea, que quantifica lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

A quantificação dos níveis de colesterol é importante para diagnóstico e classificação de hiperlipidemias, visto que um aumento dos níveis de colesterol indica um fator de risco para patologias cardíacas, hepáticas e intestinais. Todavia, existem fatores que influenciam os níveis normais de colesterol tais como, a idade, o sexo, o equilíbrio hormonal, o *stress* e a gravidez. (12)

Lipoproteínas de alta densidade (HDL)

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, isto é, transportam o colesterol presente nos tecidos para o fígado. Assim, a concentração de colesterol diminui na corrente sanguínea e nos órgãos.

A quantificação de níveis séricos de colesterol HDL é importante para a identificação de doenças de risco. Níveis elevados de colesterol HDL estão associados a doenças coronárias, enquanto níveis baixos de colesterol HDL estão associados ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. (12)

Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são responsáveis pelo transporte do colesterol esterificado do fígado para os tecidos. As LDL contribuem para a formação de placas de gordura que se acumulam dentro dos vasos sanguíneos. Desta maneira, uma maior concentração de LDL indica uma maior quantidade de colesterol na corrente sanguínea e nos órgãos. Consequentemente, as LDL estão associadas a doenças cardiovasculares. (12)

5.2.2. Metabolismo ósseo mineral

O sistema esquelético é um dos maiores do corpo humano, desempenhando um papel de extrema importância no armazenamento de cálcio. O cálcio realiza a mineralização deste sistema, tendo um papel importante ao nível do desempenho de funções mecânicas, mas também metabólicas e protetoras. O controlo metabólico do cálcio está diretamente relacionado com o fosfato e o magnésio. Assim, o laboratório de bioquímica apresenta um papel importante na avaliação destes três minerais, uma vez que alterações dos níveis plasmáticos dos mesmos estão associadas a patologias e, desta forma, podem ser diagnosticadas e tratadas. (12)

Cálcio

O cálcio encontra-se em ambiente intracelular e em ambiente extracelular.

Em ambiente extracelular, o cálcio encontra-se na sua maioria na corrente sanguínea e está distribuído em três formas distintas, sendo a sua forma livre a que é frequentemente quantificada em laboratório por ser a sua forma ativa. As outras duas formas de cálcio em ambiente extracelular são cálcio associado a proteínas e cálcio complexado a pequenos iões. As suas principais funções neste ambiente são a mineralização óssea e participação ativa na cascata de coagulação.

Em ambiente intracelular, o cálcio desempenha funções como a contração muscular esquelética e cardíaca (envolvimento no potencial de membrana), secreção hormonal, divisão celular e metabolismo do glicogénio.

A quantidade de cálcio sérico (calcemia) é mantida fixa pela ação conjugada da paratormona, da vitamina D e da calcitonina. Assim, a hipercalcemia pode ser relacionada com um aumento da destruição óssea, diminuição da excreção renal, ou aumento da vitamina D, causando excitabilidade muscular. Em caso de hipocalcemia, associa-se ao défice de vitamina D, ou a patologias renais, causando perda muscular. (12)

Fosfato

O fosfato presente no sangue provém da dieta, mas também do metabolismo ósseo. Quando existe consumo de fosfato, este é absorvido no intestino. Quanto à sua eliminação, é filtrado pelo glomérulo e reabsorvido nos túbulos renais.

No caso de hiperfosfatemia, há uma associação à falência renal crônica ou excesso de consumo de fosfato. Já a hiperfosfatemia associa-se a um consumo excessivo de álcool, carências alimentares ou vômitos. (12)

Magnésio

O magnésio é um mineral essencial que está envolvido em várias funções bioquímicas, como na formação de ossos e dentes e funcionamento normal dos músculos e nervos. Trata-se do cátion mais abundante nas células, que é absorvido no intestino e é excretado e controlado a nível renal. Um aumento dos níveis séricos do magnésio é raro, no entanto é iatrogénico. Um decréscimo dos níveis está relacionado com o mau funcionamento gastrointestinal e renal. (12)

5.2.3. Ionograma

O ionograma permite determinar a concentração dos principais iões presentes no organismo, como o cloro (Cl⁻), o potássio (K⁺) e o sódio (Na⁺). Por este motivo, é importante realizar o estudo do equilíbrio hidroeletrólítico para avaliar os níveis dos eletrólitos que têm um papel fundamental na manutenção do equilíbrio do organismo. Estes existem tanto no espaço extracelular como no espaço intracelular e devem estar em constante equilíbrio (homeostase).

O desequilíbrio destes principais eletrólitos pode ser a causa ou a consequência de várias patologias, como por exemplo, patologias renais ou disfunção no equilíbrio ácido-base. Esta análise pode ser efetuada tanto no soro como na urina, dependendo da patologia em causa. (12)

Na tabela 2, representa-se a interpretação dos níveis do ionograma, fazendo alusão à descrição e interpretação clínica de cada parâmetro.

Tabela 2: Interpretação e descrição dos resultados do ionograma.

Parâmetro	Descrição	Interpretação clínica
Cloro	Principal anião extracelular, os seus níveis séricos correspondem a aumentos e diminuições do sódio.	Aumento: doença dos túbulos renais (decréscimo de excreção de H^+ , leva a um decréscimo de reabsorção de HCO_3^-), acidose metabólica (diarreia prolongada).
		Diminuição: vômito prolongado (perda de HCl), perda de sal em consequência de doença renal.
Potássio	Principal catião intracelular, responsável pela manutenção do batimento cardíaco e pela contração muscular.	Aumento: confusão mental, diminuição da frequência cardíaca (paragem cardíaca), desidratação, cetoacidose diabética, paralisia.
		Diminuição: fraqueza muscular, irritabilidade, batimento cardíaco acelerado (ataque cardíaco).
Sódio	Catião extracelular, responsável pela manutenção da pressão osmótica e regulação do fluído corporal. Os seus níveis sanguíneos são regulados através da excreção e reabsorção nos rins.	Aumento: Síndrome de <i>Cushing</i> , desidratação grave, consumo excessivo de sal sem compensação de água, diabetes <i>insipidus</i> .
		Diminuição: excessiva utilização de diuréticos, perda gastrointestinal prolongada (vômitos ou diarreia), doença renal, acidose metabólica.

5.2.4. Função renal

O rim tem um papel muito importante no organismo, pois considera-se o sistema purificador do organismo. As principais funções dos rins incluem a filtração, reabsorção e excreção de vários metabolitos.

A determinação dos parâmetros bioquímicos descritos abaixo, constituem uma ferramenta útil no diagnóstico de alterações da função renal.

Ácido úrico

O ácido úrico é um metabolito das purinas, ácidos nucleicos e nucleoproteínas. Desta forma, níveis séricos elevados de ácido úrico, indicam perturbações no metabolismo destas substâncias, estando diretamente relacionadas com o excesso da síntese purinas.

Em consequência deste excesso, originam patologias, como por exemplo, da Gota, disfunções renais a nível da filtração glomerular.

Em situações de disfunção renal, o ácido úrico pode-se acumular nas articulações (gota) ou nos rins (cálculos renais). (12)

Creatinina

A creatinina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas. A quantificação de creatinina sérica é utilizada no diagnóstico e monitorização de patologias renais.

A creatinina é eliminada da corrente sanguínea por filtração glomerular. Desta forma, a creatinina é um bom indicador da função renal, por ser eliminada a uma velocidade constante. Quando existem valores elevados de creatinina no sangue, significa que a taxa de filtração glomerular está diminuída, indicando, assim, uma lesão a nível renal. (12)

Ureia

O catabolismo de aminoácidos e proteínas produzem amónia. Uma vez que a amónia é tóxica para o organismo, esta é convertida em ureia no fígado. Desta maneira, a ureia é eliminada do organismo por filtração a nível renal através da urina.

A determinação da ureia no soro é, frequentemente, utilizada para a avaliação renal. No entanto, a concentração sérica da ureia depende da funcionalidade do rim, mas também da quantidade de proteína ingerida na dieta, uma vez que esta é reabsorvida no túbulo proximal de forma passiva. Como descrito anteriormente, a ureia é medida para avaliação renal, contudo não é considerada um parâmetro de excelência, sendo sempre utilizada com a medição da creatinina. (12)

Microalbuminúria

A microalbuminúria acontece quando há perda de quantidades de albumina através da urina e, por isso, é um teste eficaz para a deteção precoce de patologias a nível da filtração glomerular, a permeabilidade e a pressão dentro do glomérulo. Estas alterações favorecem a filtração da albumina que passa a ser eliminada na urina.

As principais causas de microalbuminúria são diabetes, hipertensão, doença renal crónica, alimentação rica em proteínas, entre outras. (12)

5.2.5. Função hepato-biliar

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano e relaciona-se com diversas funções, entre elas, a produção de bÍlis, armazenamento, biotransformação, desintoxicação, envolvimento na fagocitose e ainda síntese de proteínas. (12)

Os parâmetros abaixo descritos são alguns dos que possuem capacidade de avaliação da função hepática.

Alanina Aminotransferases (ALT/GTP) e Aspartato Aminotransferase (AST/GOT)

A alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) são enzimas presentes nas células do fígado (hepatócitos). Estas enzimas são excelentes biomarcadores de lesões hepáticas quando quantificadas juntamente, uma vez que medem a presença e o grau da inflamação hepática, isto é, concentrações séricas elevadas destas enzimas refletem situações de dano hepatocelular. Deste modo, estas enzimas são libertadas para a corrente sanguínea em consequência de uma lesão hepática com diversas origens.

A AST encontra-se tanto a nível hepatocelular como também a nível ósseo, rins, hemácias, músculo cardíaco e esquelético. Desta forma, a AST pode ser associada a patologias nos diversos tecidos onde se encontra. (13)

Por outro lado, a ALT encontra-se sobretudo no fígado, pelo que é considerada um indicador mais específico do que a AST, para doenças hepáticas. No entanto, esta especificidade não é absoluta, visto que a ALT também se encontra nos músculos e no coração, mas em menores concentrações. Porém, aquando de uma atividade física intensa pode-se verificar um aumento na concentração da ALT. Outra vantagem da ALT é que persiste por mais tempo na corrente sanguínea, aumentando assim a janela de diagnóstico. (14)

Alterações dos valores de AST e ALT, estão associadas a diversas patologias, tais como, hepatites, consumo de medicamentos, abuso do consumo de álcool e drogas, cancro, entre outras.

Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima presente em diversos tecidos do corpo humano como no fígado, ossos, rins, placenta e mucosa intestinal, apresentado maior concentração no fígado e ossos. (15)

Um aumento da concentração da ALP a níveis séricos revelam patologias ao nível do sistema biliar, como por exemplo obstrução hepática, colestases, neoplasias, e a nível ósseo, como por exemplo a doença de Paget, fraturas, osteomalácia. (16)

De salientar que a ALP não é um biomarcador específico do fígado, contudo ao ser avaliada em conjunto com outros parâmetros como AST, ALT, Gama-Glutamiltransferase (GGT), Bilirrubina total e direta, é importante para despiste de patologias hepáticas.

Quando apenas o nível de ALP está muito elevado e, os níveis de AST, ALT, GGT e Bilirrubina total e direta encontram-se normais, provavelmente trata-se de um aumento da atividade de formação óssea.

Gama-Glutamiltransferase (GGT)

A Gama-Glutamiltransferase é uma enzima que se encontra em todo o corpo, embora exista principalmente no fígado. Quando GGT é libertada para a corrente sanguínea é uma consequência do fígado ou dutos biliares danificados, isto é, níveis séricos elevados de GGT na corrente sanguínea pode indicar doença hepática ou lesão dos dutos biliares.

Assim, a GGT é quantificada para pesquisa de situações de obstrução e infeção hepática e biliar, alcoolismo e alta concentração de fármacos. O álcool estimula a síntese de GGT e, por isso, o seu doseamento é útil para detetar casos de alcoolismo. (12)

Bilirrubina total e direta

A bilirrubina é o maior metabolito do grupo heme, resultante da decomposição dos glóbulos vermelhos.

Após ser produzida, a bilirrubina é transportada para o fígado, ligada à albumina uma vez que é insolúvel em água. Esta fração de bilirrubina é denominada por bilirrubina indireta (bilirrubina não-conjugada). Assim, a sua concentração sérica aumenta.

Já no fígado, a bilirrubina assume a forma livre, pois já não se encontra ligada à albumina e, assim, é conjugada com o ácido glucorónico de maneira a formar a bilirrubina direta (bilirrubina conjugada), que é excretada através do sistema biliar para o intestino. A concentração sérica da bilirrubina direta, em condições fisiologicamente normais é mínima ou nula.

A bilirrubina total é a soma da bilirrubina direta e indireta. (12)

No laboratório Avelab, apenas se quantifica a bilirrubina total e direta, sendo a indireta a subtração das duas anteriormente mencionadas.

5.2.6. Metabolismo do ferro

Em condições fisiológicas normais, o ferro encontra-se presente a nível celular, plasmático e em outros fluídos extracelulares, em pequenas quantidades. Desta maneira, o ferro apresenta-se distribuído na hemoglobina na forma armazenada (ferritina), na mioglobina e na transferrina (transporte de ferro). Variações nos níveis séricos do ferro, originam patologias que necessitam de diagnóstico, tratamento e monitorização. (12)

Ferro, Ferritina e Transferrina

O ferro está presente no organismo na mioglobina e na hemoglobina. A transferrina (proteína transportadora), transporta o ferro até aos tecidos, onde este é armazenado na forma de ferritina, de maneira a não sofrer danos oxidativos.

Tanto as quantidades elevadas de ferro como o défice férrico devem ser diagnosticadas com os três parâmetros (ferro, ferritina e transferrina) em simultâneo.

Níveis elevados destes parâmetros podem significar patologias como anemia hemolítica e doenças hepáticas agudas. Níveis reduzidos destes parâmetros representam patologias hepáticas crónicas, anemia crónica, neoplasias, entre outras. (12)

UIBC

O doseamento do ferro e da capacidade não saturada de ligação do ferro (UIBC), traduz a quantidade de transferrina não saturada, e realiza-se em amostra de soro e plasma. Este parâmetro contribui para a avaliação do metabolismo do ferro, sendo importante na investigação de anemias. O UIBC encontra-se significativamente elevada em anemias por deficiência de ferro. Contudo, um nível baixo de UIBC pode significar neoplasias e distúrbios inflamatórios crónicos. (12)

5.2.7. Metabolismo Hidratos de carbono

Glucose

A principal fonte de energia para muitos tecidos é a glucose, esta é regulada pela insulina e pelo glucagon.

O exame de glucose tem como objetivo verificar a quantidade de açúcar no sangue (glicemia). Este é o principal ensaio para diagnosticar a diabetes. Para realizar o ensaio, o utente precisa de

estar em jejum, para que o resultado não seja influenciado e, assim, possa não ser um falso-positivo para a diabetes.

Alterações no metabolismo da glucose correspondem na maioria dos casos, a um hiperglicemia, ou em menor acréscimo, a uma hipoglicemia.

Níveis elevados de glucose (hiperglicemia) também podem ocorrer em casos de neoplasma pancreático, hipertireoidismo, hiperfunção cortical, entre outras disfunções. Níveis reduzidos de glucose (hipoglicemia) podem resultar da terapêutica excessiva com insulina ou de doenças hepáticas. (12)

5.2.8. Proteínas

As proteínas encontram-se integradas nas células, órgãos e fluídos, estando por sua vez envolvidas em múltiplos processos.

As proteínas com interesse para a Bioquímica Clínica são as que circulam no sangue, estas incluem as proteínas plasmáticas, as proteínas de transporte e as proteínas de defesa.

Proteínas totais

O valor das proteínas totais séricas pode sofrer alterações por variação de uma ou mais proteínas específicas ou por variação do volume de água no plasma.

A quantificação das proteínas totais no sangue reflete o estado nutricional da pessoa e, pode ser usada no diagnóstico de doenças renais, hepáticas e de outros distúrbios. Assim, em caso de doença existe alteração do nível plasmático ou da fração individual das proteínas em relação aos valores normais.

Situações de hiperproteinemia pode ocorrer em casos graves de desidratação ou mieloma múltiplo. Em caso de hipoproteinemia pode acontecer em má absorção das proteínas, queimaduras graves, hemorragia generalizada ou síndrome nefrótico.

Proteína C reativa

A proteína C reativa é a proteína de fase aguda mais precoce pois a sua concentração aumenta em resposta a processos inflamatórios, sobretudo na resposta a infeções bacterianas ou de outros microrganismos. Esta liga-se às membranas celulares de células mortas ou lesionadas, ativando o processo de fagocitose. Contudo, deve ser analisada juntamente com outros

parâmetros com maior especificidade visto que não expressa inflamação ou lesão em nenhum órgão em específico.

No entanto, a proteína C reativa é um bom biomarcador de diagnóstico de infecção e inflamação e, também auxilia na monitorização da resposta a terapêutica farmacológica ou cirúrgica. Este é um parâmetro muito sensível, contudo é pouco específico. (12)

Albumina

A albumina é a proteína em maior concentração em circulação na corrente sanguínea. Esta é sintetizada pelo fígado e, está envolvida no transporte de várias substâncias como o cálcio, bilirrubina e fármacos, mas também contribui para a manutenção da pressão osmótica.

Normalmente, níveis séricos diminuídos de albumina, hipoalbuminémia, ocorrem em diversas patologias, como doença renal, hepática, má absorção, desnutrição, queimaduras graves e em situação de malignidade. Nos casos de hiperalbuminémia, níveis séricos aumentados de albumina, estão relacionados com a desidratação. (12)

5.3. Casos Clínicos

Neste subcapítulo descreve-se alguns casos clínicos em contexto real realizados durante o estágio curricular no laboratório Avelab. De salientar que não são divulgados os nomes dos utentes assim como os números mecanográficos associados por questões de privacidade.

Caso 1: Análise bioquímica de rotina em utente

Apresentam-se os dados clínicos laboratoriais de uma utente, com 47 anos. Na tabela 3 evidenciam-se valores obtidos para o perfil bioquímico de rotina da utente.

Tabela 3: Resultados clínicos do caso 1 da Bioquímica.

Análise	Resultado	Unidades	Valores de Referência
Creatinina	0,56	mg/dL	0,57 - 1,11
Sódio	136	mEq/L	135 - 145
Potássio	6,3	mEq/L	3,6 - 5,0
Cloro	104	mEq/L	101 - 109
Colesterol HDL	7	mg/dL	-
TGO/AST	276	U/L	< 35
TGP/ALT	81	U/L	< 35
Fosfatase Alcalina	186	U/L	40 - 150
Gama-GT	522	U/L	9 - 36
Bilirrubina Total	22,68	mg/dL	0,20 - 1,20

Interpretação clínica:

Provavelmente trata-se de uma patologia ao nível hépato-biliar uma vez que os marcadores bioquímicos estão significativamente elevados em comparação com os valores de referência. A utente teve indicação dos valores críticos e também recomendação imediata de ir ao médico para ter um diagnóstico mais complementarizado em conjunto de outros exames.

Relativamente ao valor do Colesterol HDL, a utente deve ter uma alimentação rica em gorduras, sem prática de exercício físico.

Caso 2: Análise bioquímica de rotina em utente

Apresentam-se os dados clínicos laboratoriais de um utente, com 67 anos. Na tabela 4 evidenciam-se valores obtidos para o perfil bioquímico de rotina com doença cardiovascular.

Tabela 4: Resultados clínicos do caso 2 da Bioquímica

Análise	Resultado	Unidades	Valores de Referência
Triglicéridos	1094	mg/dL	< 150
TGO/AST	137	U/L	< 35
TGP/ALT	98	U/L	< 35
Gama-GT	634	U/L	9 - 36
Colesterol Total	209	mg/dL	< 190
Colesterol LDL	51	mg/dL	< 130
Colesterol HDL	26	mg/dL	-

Interpretação clínica:

Confirmação de diagnóstico de doença cardiovascular. Valores de triglicérides e colesterol total elevados em comparação aos valores de referência.

Valores de GGT, TGO/AST e TGP/ALT também elevados em relação ao valor de referência. Esta alteração pode dever-se de toma excessiva de medicamentos, consumo de álcool ou doença hépato-biliar. Desta forma, o utente foi contactado para mostrar o mais breve as análises ao seu médico, uma vez que não tem histórico de valores tão elevados a este nível.

5.4. Validação Médica no setor da Bioquímica

No Laboratório Avelab, após todos os parâmetros serem analisados, estes caem na bolsa do programa Apollo para serem validadas automaticamente pelos técnicos do setor. Contudo, caso haja alguma alteração significativa este não é validado automaticamente. O profissional de diagnóstico e terapêutica deve ter espírito crítico bem como o historial clínico fornecido. No caso de inexistência de historial clínico, os técnicos do setor tentam perceber as alterações junto do utente, contactando-o. Em caso de valores críticos o utente é avisado para se dirigir a uma unidade de saúde.

6. Análise Imunológica

A imunologia abrange várias áreas da medicina relacionadas com o equilíbrio do organismo e com todos os mecanismos de defesa contra qualquer agente externo ou interno que venha perturbar esse equilíbrio. Desta forma, pode-se detetar a presença de antigénios (Ag), substância estranha que induz uma resposta imune, e anticorpos (Ac), proteínas do soro que reagem com uma substância estranha. O próprio organismo também pode produzir os agentes agressores, isto é, doença autoimune.

Assim, a imunologia estuda, deteta e quantifica a resposta do organismo a agentes patogénicos, através de células do sistema imunitário.

As barreiras físicas, primeira linha de defesa do sistema imunitário contra agentes invasores, é constituída por a pele, membranas mucosas, células ciliadas e secreções como a saliva, suor e urina. Na perda de uma destas barreiras, o organismo produz dois tipos de resposta, inata ou adquirida.

A imunidade inata está sempre presente, ou seja, pronta para atacar contra os agentes infecciosos. No entanto, muitos microrganismos evoluíram para resistir à imunidade inata. Deste mecanismo fazem parte macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células "*Natural Killer*", células dendríticas e o sistema complemento que induz um conjunto de respostas contra os agentes patogénicos. Desta forma, ocorre a ativação de leucócitos, que por sua vez libertam mediadores inflamatórios e, assim, induzem a última linha de defesa, a imunidade adquirida.

O sistema imunológico inato deteta patogénicos por meio de recetores de reconhecimento de padrões, que desencadeiam a ativação das defesas antimicrobianas e estimulam a resposta imune adaptativa. (17)

A imunidade adaptativa não se encontra presente desde o nascimento, é estimulada pela exposição a um microrganismo, isto é, a imunidade adquirida. A imunidade adquirida ataca cada Ag e começa a desenvolver uma memória para aquele Ag, é específica uma vez que ataca um Ag específico previamente encontrado. Tem capacidade de aprender, adaptar e lembrar. No entanto, a imunidade adquirida leva algum tempo para se desenvolver após o primeiro contacto com o Ag. No segundo contacto ao Ag esta será mais rápida, visto que é lembrada pelos linfócitos. Os linfócitos podem ser células B ou células T, estas trabalham em conjunto de modo a destruir os invasores.

No Laboratório Avelab, o setor da imunologia realiza diversos ensaios através do Alinity ci-series para o estudo de alergias, autoimunidade, endocrinologia, anemia, serologia infecciosa, pesquisa e monitorização de marcadores tumorais, entre outros.

Este equipamento integra o sistema Alinity i, isto é, um analisador de imunoensaio automatizado que utiliza o princípio do imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes. As reações são medidas como unidades relativas de luz, que têm uma relação direta ou inversa com as quantidades de analito na amostra.(1)

A forma de processamento das amostras assim como o equipamento estão descritos no capítulo anterior, capítulo da Bioquímica. Contudo há uma ligeira diferença em relação ao módulo da Bioquímica, uma vez que os controlos da imunologia são realizados diariamente e não quando o equipamento apresenta o sinal da falha do mesmo.

Desta forma, diariamente todos os controlos para todas as análises são realizados. Estes controlos apresentam três níveis de controlo, sendo o nível 1 o não patológico, o nível 2 o intermediário e o nível 3 o patológico. As calibrações são realizadas apenas quando o aparelho deteta que são necessárias ou quando existe mudança de lotes de reagentes.

6.1. Ensaios Imunológicos

Os ensaios imunológicos são métodos baseados na reação antígeno-anticorpo que produzem um imunocomplexo detetável. A partir do método de deteção e do imunocomplexo, existe vários tipos de ensaios imunológicos.

Os métodos de analitos podem ser do tipo competitivo ou não competitivo utilizando como método de deteção a fluorescência e a quimioluminescência.

6.1.1. Ensaio Imunológico competitivo

Os ensaios imunológicos competitivos são habitualmente usados quando possui apenas um determinado Ag. Desta forma, ao Ag presente na amostra do doente é adicionado um Ag idêntico, contudo este é marcado com um fluorocromo ou por outro agente de deteção. Ambos os Ag competem pela ligação a um Ac específico que se encontra ligado a uma matriz sólida. O Ag da amostra e o Ag marcado e fixo à matriz são incubados com um Ac de concentração conhecida. De seguida, quantifica-se o sinal que é inversamente proporcional à quantidade de analito na

amostra, ou seja, quanto maior a concentração do Ag de interesse, menor o sinal gerado pelo Ag marcado. (18)

6.1.2. Ensaio Imunológico não competitivo (Sandwich)

Os ensaios imunológicos não competitivos, também denominado como *sandwich*, utiliza dois Ac. O Ac primário é específico e complementar com os Ag da amostra, que, por sua vez, estabelecem complementaridade com o Ac secundário, que reconhece esses Ag numa região distinta.

A concentração do analito é diretamente proporcional à quantidade de Ac marcado, isto é, quanto maior a concentração do Ag de interesse, maior o sinal obtido. (18)

6.2. Metodologias Instrumentais

6.2.1. Quimioluminescência

A quimioluminescência corresponde à emissão de luz quando um eletrão de um nível energético superior, ou do estado excitado, reduz o seu nível de energia, isto é, transita para um nível energético inferior. A excitação é causada por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico, como por exemplo, luminol, isoluminol, acridínio ou luciferina, por um agente oxidante, tais como o peróxido de hidrogénio, hipoclorito ou oxigénio.

Nos ensaios de quimioluminescência o Ac é marcado com um composto quimioluminescente que emite luz quando combinado com um reagente trigger (como o luminol ou o isoluminol). Estes emitem grandes quantidades de luz que é diretamente proporcional à concentração de Ag presentes na amostra, tornando, desta forma, o método mais sensível. (19)

6.3. Parâmetros Imunológicos

Neste subcapítulo serão abordados apenas os parâmetros imunológicos avaliados no setor da imunologia do Avelab com mais frequência e com quais contactei frequentemente.

6.3.1. Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são substâncias que estão presentes no sangue, urina ou tecidos biológicos, cujo seu aparecimento ou alteração das suas concentrações estão relacionados com

o crescimento de células neoplásicas, ou seja, numa concentração superior de um determinado nível pode indicar a existência de um tumor. Normalmente são classificados de acordo com a sua origem ou estrutura química.

Embora um nível anormal de um marcador tumoral poder sugerir a presença de tumor, isto, não é suficiente para diagnosticar, uma vez que, devem ser sempre acompanhados de outros exames clínicos devido à baixa especificidade e sensibilidade dos marcadores tumorais. Desta forma, os marcadores tumorais continuam com a sua utilidade controversa. Por um lado, facilitam o diagnóstico precoce de maneira não invasiva, simples e rápida. Por outro lado, segundo as diretrizes clínicas, não recomendam os marcadores tumorais como testes de diagnóstico autónomos para o cancro, visto que a sua sensibilidade e especificidade continuarem limitadas. (20)

Na prática clínica, os marcadores tumorais são muito úteis no auxílio ou complemento ao diagnóstico, desde que utilizados em conjunto com outros meios, na avaliação da resposta à terapêutica e na sua monitorização, na deteção precoce de recidivas e no estabelecimento de prognóstico. (21)

No Laboratório Avelab, os marcadores tumorais são determinados em amostras de soro, plasma e urina 24 horas. O equipamento automatizado é o descrito no capítulo anterior, e, dessa forma, são analisados apenas alguns marcadores tumorais, descritos posteriormente. Os restantes marcadores tumorais são enviados para um laboratório externo uma vez que não existe um volume suficiente de amostras para suportar os custos dos reagentes.

Antigénio carcinoembrionário (CEA)

O antigénio Carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína de membrana com capacidade de se expressar em vários tipos de cancro tais como, pulmão, mama, cólon, pâncreas e estômago. (20) De forma a aumentar a precisão de diagnóstico, o CEA deve ser complementado com outros biomarcadores, o antigénio carbohidratado 125 e o antigénio hidrocarbonado 19-9, uma vez que o CEA não é um marcador específico do cancro.

Antigénio hidrocarbonado 19-9

O antigénio hidrocarbonado 19-9 (CA 19-9) é um complexo glicoproteico da superfície celular com elevado peso molecular, conhecido como Ag de Lewis. (21)

O CA 19-9 é o marcador sugerido para auxiliar no diagnóstico de cancro do pâncreas, bem como na monitorização da terapêutica.

A sua sensibilidade está relacionada com o estadió do tumor e ao fenótipo Le. Os três tipos de fenótipos sanguíneos Le dependem da presença ou ausência dos epítópos antigénicos Le, Le^a, Le^b. (22)

O CA 19-9 é conhecido por ser um marcador tumoral de neoplasias bilio-pancreáticas. Contudo, não se pode considerar o CA 19-9 um marcador tumoral específico para neoplasias bilio-pancreáticas, uma vez que os níveis de CA 19-9 encontram-se elevados no cancro do pâncreas, fígado, vesícula biliar, colo-retal, gastrointestinais e ainda, em algumas patologias benignas como pancreatite, insuficiência renal, endometriose e neoplasias broncopulmonares. (23)

Antigénio carbohidratado 125

O antigénio carbohidratado 125 (CA 125) é uma glicoproteína transmembranar de alto peso molecular pertencente à família das mucinas.

O CA 125 é utilizado clinicamente como marcador tumoral de cancro de ovários. Assim, o CA 125 desempenha um papel importante no diagnóstico e na avaliação da progressão e eficácia da terapêutica contra o carcinoma do ovário. Contudo, níveis elevados de CA 125 também estão associados a doenças malignas ao nível dos pulmões, endométrio, colorretal.

Os níveis de CA 125 também estão elevados em condições fisiológicas como gravidez, menstruação, cirrose hepática, doença inflamatória pélvica, trauma peritoneal e cancro do pulmão. (24)

Antigénio específico da próstata

O antigénio específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína produzida pela próstata, secretado no sémen ou perdido na urina e está presente no sangue em níveis muito reduzidos.

Apesar do marcador PSA ser específico para próstata, não pode ser utilizado para diagnóstico de cancro da próstata, uma vez que os níveis de PSA tendem a aumentar com o aumento da próstata em consequência da idade do utente, exercício físico intenso, manipulação prostática vigorosa. (25) Assim, a utilização do PSA é otimizada quando combinada ao exame de toque retal. (21)

6.3.2. Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) pode ser a causa de patologias graves, tanto em crianças, como em adultos. O CMV pode persistir no organismo de uma pessoa infetada durante anos e causar infeções recorrentes ou ser transmitido a outras pessoas. É um vírus facilmente transmitido pelo contacto sexual e não sexual, através de secreções do corpo. (26)

Em grávidas ou doentes com o sistema imunitário deprimido, este vírus pode trazer complicações. No caso das grávidas que já tem Ac contra o CMV, o risco de reativação da infeção, e consequente transmissão ao feto é muito baixa. Contudo, se detetar uma nova infeção por CMV durante a gestação, realiza-se uma amniocentese para se verificar se o feto foi infetado com o vírus.

O diagnóstico da infeção pelo CMV é feito através de sangue específico, que mostra se existem Ac para o vírus. Quando o resultado é "CMV IgM reativo", indica que a infeção pelo vírus ainda está no início, mas se o resultado for "CMV IgG reativo", significa que o vírus está presente há mais tempo no organismo. É importante salientar que um resultado positivo ou reativo de IgG não indica necessariamente que a infeção está ativa. Para isso, é importante que seja realizado o exame de IgM para CMV, já que essa imunoglobulina (Ig) é a primeira a ser produzida quando existe uma infeção.

Na gravidez, caso o resultado seja "IgM reativo", a grávida deve de iniciar tratamento com antivirais ou imunoglobulinas, para evitar a transmissão para o bebé.

Se o valor de IgG for maior ou igual a 6 UA/mL considera-se que o exame é positivo/reactivo e, indica que a pessoa entrou em contacto com o vírus numa infeção antiga ou teve uma infeção recente. Neste caso é importante avaliar a presença de IgM na circulação para se verificar se a infeção está ativa.

Se o valor de IgG for menor que 6 UA/mL considera-se o resultado negativo, indica que a pessoa nunca teve contacto com o vírus, ou esteve há poucos dias com uma infeção aguda. Neste caso é importante avaliar a presença ou ausência de IgM.

No laboratório Avelab, quando um resultado é positivo/ reativo para a pesquisa de Ac anti-CMV tanto para IgM como para IgG, o ensaio é repetido. No caso de confirmação de resultado positivo, a amostra é enviada para o Laboratório de Ambar para a realização de um teste confirmatório por immunoblot.

Tabela 5: Interpretação dos resultados para pesquisa de Ac anti-CMV.

Resultado	Interpretação	Medidas Recomendadas
IgM- IgG+	Valores elevados de IgG indica presença de Ac contra CMV (imunidade). Valores baixos de IgG requer repetição do ensaio ao fim de 3 semanas.	Após repetição do ensaio, se IgG e IgM constantes indica infecção antiga. Se existir um elevado aumento de IgG indica uma infecção ativa sem IgM. Se aumentar Ac IgG ou aparecer Ac IgM, indica uma reinfeção.
IgM+ IgG-	Início de infecção ou presença de IgM não específica. Repetição de ensaio após 4 semanas.	Após repetição do ensaio, se o valor permanecer constante estamos perante uma IgM não específica. Se existir aumento da IgM e/ou aparecimento de IgG é indicação de primo-infecção.
IgM+ IgG+	Infeção recente ou resultado falso positivo devido a IgM residuais.	Realização de teste de Avidéz.
IgM- IgG-	Nunca teve contacto com o vírus.	Deve-se tomar medidas de prevenção para evitar infecção.

6.3.3. Rubéola

A rubéola é uma doença infecciosa causada pelo vírus da rubéola, é caracterizada por erupções (manchas) vermelhas na pele. É uma infecção viral contagiosa que se transmite de pessoa para pessoa quando alguém infetado com a doença espirra, tosse ou fala, por exemplo, é mais propício acontecer durante a infância.

O vírus transmite-se por contacto com secreções nasofaríngeas por dispersão de gotículas de pessoas infetadas quando, por exemplo, uma pessoa infetada tosse, espirra ou fala, e podem ser inaladas ou pousar na boca, nariz ou olhos de pessoas que estão próximas.

O vírus pode ainda ser transmitido da mãe para o feto, durante a gravidez, através da corrente sanguínea da mãe com infecção da placenta. Quando a infecção é adquirida durante a gestação, trata-se de rubéola congénita. Neste caso, a doença pode provocar graves complicações no feto, principalmente se a infecção ocorrer nas primeiras 16 semanas de gravidez.

O diagnóstico inicial da rubéola é feito pelo médico a partir da avaliação dos sinais e sintomas apresentados pela pessoa, além de ser indicada a realização de exame de sangue para verificar a presença de Ac IgG e IgM contra a rubéola.

Geralmente, se tem Ac do tipo IgM significa que está com infeção, enquanto a presença de Ac do tipo IgG são mais comuns em quem já teve a doença ou quem está vacinado. Contudo, apesar de na maioria dos casos a rubéola IgG reativa ou positiva ser devido à vacinação, este valor também pode ser devido à infeção recente ou antiga e, por isso, é importante fazer outros exames para confirmação de resultados.

A análise da amostra de sangue serve para identificar a quantidade de Ac do tipo IgG a circular na corrente sanguínea, assim é possível determinar se há infeção recente, antiga ou imunidade. Para além do exame serológico IgG, também é realizado o Ac IgM contra a rubéola. Realiza-se os exames para IgG e IgM uma vez que estes Ac são produzidos pelo organismo como consequência de uma infeção e, são específicos para o agente infeccioso.

Numa primeira fase de infeção, os níveis de IgM aumentam e, por isso, considera-se um marcador agudo de infeção. À medida que a doença se desenvolve, há um aumento dos níveis de IgG na corrente sanguínea que, posteriormente, continuam em circulação mesmo depois da infeção e, por isso, considera-se um marcador de memória. (27)

Tabela 6: Interpretação dos resultados para pesquisa de Ac anti-rubéola.

Resultado	Interpretação	Medidas Recomendadas
IgM- IgG+	Valores elevados de IgG indica presença de Ac contra Rubéola (imunidade). Valores baixos de IgG requer repetição do ensaio ao fim de 3 semanas.	Após repetição do ensaio, se IgG e IgM constantes indica infeção antiga. Se existir um elevado aumento de IgG indica uma infeção ativa sem IgM. Se aumentar Ac IgG ou aparecer Ac IgM, indica uma reinfeção.
IgM+ IgG-	Infeção aguda recentemente. Repetição do ensaio após 4 semanas.	Após repetição do ensaio, se o valor permanecer constante estamos perante uma IgM não específica. Se existir aumento da IgM e/ou aparecimento de IgG é indicação de primo-infeção.
IgM+ IgG+	Infeção ativa recente.	Repetição do ensaio para confirmação de resultados.
IgM- IgG-	Nunca existiu contacto com o vírus, não possui Ac contra a doença.	Medidas de prevenção para evitar infeção em mulheres grávidas.

6.3.4. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infeção causada pelo parasitea protozoário *Toxoplasma gondii*. A toxoplasmose é das parasitoses mais comuns nos gatos, uma vez que a sua reprodução sexual ocorre nas células que revestem o intestino dos felinos. Assim, os ovos do parasite encontram-se nas fezes dos gatos.

A transmissão de toxoplasmose pode ocorrer aquando da ingestão de alimentos crus ou malcozinhados que contenham a forma inativa do parasite, quisto, ou após o contacto com terrenos que contenham fezes de gatos com ovos. Durante a gravidez, se uma mulher for infetada, a infeção pode ser transmitida ao feto através da placenta, com consequência de aborto ou toxoplasmose congénita.

A toxoplasmose congénita pode ser assintomática, contudo pode apresentar sintomas graves e rapidamente mortais. (28)

O diagnóstico é através de análises ao sangue que demonstram a presença de Ac contra o parasite.

O resultado IgG reativo para toxoplasmose significa que existem Ac circulantes na corrente sanguínea contra o *T. gondii*, pode ter acontecido devido a uma infeção recente ou antiga. Contudo, o resultado reativo para IgG da toxoplasmose não indica necessariamente que a pessoa está infetada no momento, por isso, é necessário que também seja realizada os níveis de IgM. Esta Ig começa a ser produzida assim que há infeção e, desta forma, é considerada um marcador de infeção recente.

No Laboratório Avelab quando um resultado é reativo para a pesquisa de Ac anti-toxoplasma IgG e IgM, o ensaio é repetido. Após a repetição do ensaio e, caso de volte a confirmar o resultado reativo, a amostra é enviada para um Laboratório no exterior para realização de um teste confirmatório por outro método.

Tabela 7: Interpretação dos resultados para pesquisa de Ac anti-toxoplasma.

Resultado	Interpretação	Medidas Recomendadas
IgM- IgG+	Infeção antiga (imunidade) ou primo-infeção sem IgM. Repetição de ensaio.	Após repetição do ensaio, se IgM negativo e IgG estável, indica imunidade. Se IgM negativo e IgG elevada, indica uma primo-infeção sem IgM. Realização de teste de Avidéz.
IgM+ IgG-	Infeção aguda recentemente. Repetição do ensaio.	Após repetição do ensaio, se o valor permanecer constante estamos perante uma IgM não específica. Se existir aumento da IgM e/ou aparecimento de IgG é indicação de primo-infeção. Realização de consulta de alto risco para diagnóstico pré-natal.
IgM+ IgG+	Infeção recente. Realização do teste de Avidéz (IgG).	Se a Avidéz for forte, indica que a infeção ocorreu há mais de 4 meses. Se a Avidéz for fraca/ intermédia, realiza-se uma consulta de alto risco para a realização do diagnóstico pré-natal.
IgM- IgG-	Ausência de contacto com o vírus, não possui Ac contra a doença.	Vigilância serológica mensal.

6.3.5. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Este é transmitido por relações sexuais desprotegidas, partilha de seringas, transfusões sanguíneas e por transmissão vertical (gravidez, parto ou aleitamento), nos quais as partículas virais estão presentes como no sangue, sêmen e secreções vaginais.

Atualmente, o HIV divide-se em dois tipos, nomeadamente o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) e o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2 (HIV-2). Os dois tipos são muito semelhantes na estrutura morfológica, organização genómica, tropismo celular para os linfócitos T CD4+ (auxiliares), para os monócitos, macrófagos e para as células dendríticas, vias de transmissão e capacidade de causar SIDA. No entanto, o HIV-2 é menos patogénico do que o HIV-1 e, as infeções pelo HIV-2 expressam um período de latência mais longo, com uma progressão mais lenta da doença e taxas de transmissão inferiores.

Após a exposição ao vírus ocorre uma infeção aguda, com duração de 2 a 6 semanas, onde os níveis de ácido ribonucleico (RNA) viral aumentam propagando-se por todo o organismo. Nesta fase, o perigo de contágio é elevado, verificam-se sintomas semelhantes a um estado gripal e,

ainda, uma diminuição do número de linfócitos T CD4. A resposta imune induz o aumento do número de linfócitos T CD8 reativos com a finalidade de eliminar células infectadas, mas também induz a produção de Ac que favorece a diminuição do número de partículas virais na corrente sanguínea, aumentando o número de linfócitos T CD4. Nesta fase, o indivíduo entra no período de latência clínica. A duração desta fase depende da relação entre a carga viral e do número de linfócitos T CD4.

Durante a fase de latência verifica-se uma diminuição do número de linfócitos T CD4+ faz com que o indivíduo entre na fase de SIDA. (12)

No laboratório Avelab realiza-se a pesquisa de Ac contra o HIV-1 e HIV-2, através de imunoensaios enzimáticos em amostras de soro ou plasma. Na presença de um resultado reativo para a pesquisa de Ac anti-HIV, o ensaio é repetido em duplicado. Consoante os resultados obtidos, esquematizados na Figura 4, a amostra é enviada para o laboratório da Ambar para a realização de um teste confirmatório por Western blot e para a identificação do tipo de HIV.

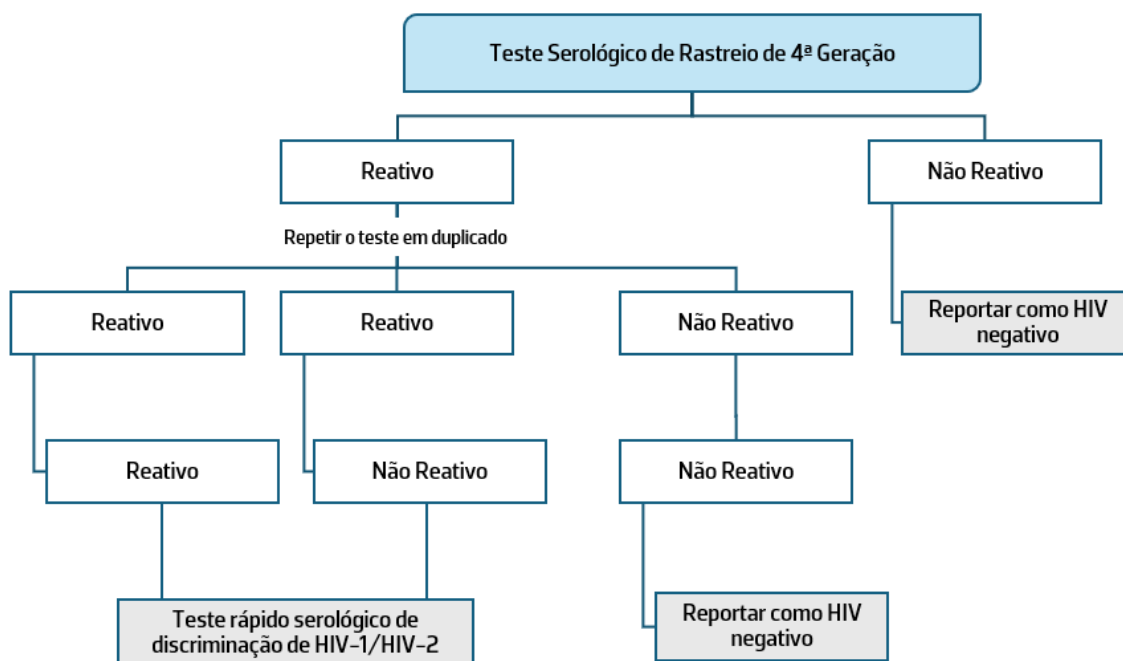


Figura 4: Normas para o diagnóstico laboratorial da infeção por HIV.

6.4. Casos Clínicos

Neste subcapítulo descreve-se alguns casos clínicos em contexto real realizados durante o estágio curricular no laboratório Avelab. De frisar que por questões de privacidade não são

divulgados nem houve acesso aos nomes dos utentes assim como os números mecanográficos associados.

Caso 1: Análise imunológica em grávida

Apresentam-se os dados clínicos laboratoriais de uma grávida, com 27 anos e gestação de 6 semanas. Na tabela 8 evidenciam-se valores obtidos para o perfil imunológico de rotina em gravidez.

Tabela 8: Resultados clínicos do caso 1 da Imunologia

Análise	Resultado	Unidades	Valores de Referência
Ac Anti-Vírus Rubéola (IgG)	7,7	UI/mL	Reativo: > 10,0 Não Reativo: < 5,0 Indeterminado: 5,0 – 10,0
Ac Anti-Vírus Rubéola (IgM)	0,06		Reativo: > 1,60 Não Reativo: < 1,20 Indeterminado: 1,20 – 1,59
Ac Anti-Citomegalovírus (IgG)	115,9	UA/mL	Reativo: >= 6,0 Não Reativo: < 6,0
Ac Anti-Citomegalovírus (IgM)	1,15		Reativo: >= 1,0 Não Reativo: < 0,85 Indeterminado: 0,85 – 0,99
Ac Anti-Citomegalovírus (Avidéz IgG)	60,7	% Avidéz	Alta Avidéz: >= 60,0 Baixa Avidéz: < 50,0 Indeterminado: 50,0 – 59,9
Ac Anti-Toxoplasma gondii (IgG)	1,3	UI/mL	Reativo: > 3,0 Não Reativo: < 1,60 Indeterminado: 1,60 – 3,0
Ac Anti-Toxoplasma gondii (IgM)	0,1		Reativo: > 0,60 Não Reativo: < 0,50 Indeterminado: 0,50 – 0,59

Interpretação clínica:

Ac anti-CMV reativo tanto para IgG como para IgM. Desta forma, foi realizado o Teste de Avidéz com resultado de “Alta Avidéz” por comparação de valores de referência. Por se tratar de uma alta avidéz, pode-se considerar uma reinfeção. Ao tratar-se de uma mulher grávida antes das 18 semanas de gestação, há uma grande probabilidade de recém-nascido infetado. O bebé pode apresentar sintomas logo no nascimento como parto prematuro, baixo peso no nascimento, icterícia, convulsões, erupção cutânea, fígado e baço aumentados e com problemas de funcionamento.

Por outro lado, o bebé pode estar saudável no momento do parto e desenvolver os sintomas mais tarde como perda de audição, atraso no desenvolvimento e ainda problemas de visão.

Caso 2: Análise Imunológica em utente oncológica

Apresentam-se os dados clínicos laboratoriais de uma utente com histórico oncológico, com 68 anos. Na tabela 9 evidenciam-se valores obtidos para o perfil imunológico de rotina.

Tabela 9: Resultados clínicos do caso 2 da Imunologia

Análise	Resultado	Unidades	Valores de Referência
Proteína C Reativa	102	mg/L	< 5,0
CA 125	4494,2	U/mL	< 35,0

Interpretação clínica:

Resultados às análises requeridas extremamente elevados por comparação de valores de referência. Pode-se considerar uma grande lesão ao nível do útero e ovários, uma vez que a utente é doente oncológica. Provavelmente, pode-se tratar de uma recidiva previsível, uma vez que o médico executa controlos periódicos de forma a executar uma deteção mais rápida. Desta forma, o médico, em conjunto com outros exames realizados terá uma monitorização da evolução da doença mais precisa e clara.

Caso 3: Análise imunológica de rotina

Apresentam-se os dados clínicos laboratoriais de uma utente não fumadora, com 69 anos. Na tabela 10 evidenciam-se valores obtidos para o perfil imunológico de rotina em utente.

Tabela 10: Resultados clínicos do caso 3 da Imunologia

Análise	Resultado	Unidades	Valores de Referência
Ferritina	236	ng/mL	10 - 291
TGO/AST	61	U/L	< 35
TGP/ALT	32	U/L	< 35
Fosfatase Alcalina	523	U/L	40 - 150
Gama-GT	362	U/L	9 - 36
Proteína C Reativa	45,2	mg/L	< 5,0
Ag Carcinoembrionário (CEA)	1089,8	ng/mL	Não Fumadores: < 5 Fumadores podem apresentar valores ligeiramente mais elevados
CA 19,9	5500,5	U/mL	< 37,0

Interpretação clínica:

Resultados mais elevados em relação aos valores de referência. Provavelmente trata-se de um cancro ao nível hépato-biliar, uma vez que parâmetros bioquímicos ao nível hépato-biliar também se encontram alterados. Contudo são necessários mais exames para ter um diagnóstico correto.

Neste caso, como a utente não tinha histórico de valores tão alterados foi contactada para mostrar ao seu médico os valores e, conseqüentemente, este realizar alguns exames de complementaridade a fim de ter um melhor diagnóstico.

6.5. Validação médica no setor da Imunologia

A validação médica no setor da Imunologia acontece de igual forma ao setor da Bioquímica. Após todos os parâmetros serem analisados, estes caem na bolsa do programa Apollo para serem validadas automaticamente pelos técnicos do setor. Contudo, caso haja alguma alteração significativa este não é validado automaticamente. O profissional de diagnóstico e terapêutica deve ter espírito crítico bem como o historial clínico fornecido. Em caso de não existir historial clínico, os técnicos do setor tentam perceber as alterações junto do utente contactando-o. Em caso de valores críticos o utente é avisado para se dirigir a uma unidade de saúde.

7. Análise Microbiológica

O principal objetivo do laboratório de Microbiologia é contribuir para o diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças infecciosas. Para isso, no laboratório são realizados variados procedimentos para isolar diferentes microrganismos, para de seguida serem determinadas as resistências e sensibilidades aos antibióticos. Este último procedimento é fundamental para que não exista um uso excessivo de fármacos.

O laboratório ainda realiza análises de rastreio de microrganismos multirresistentes. Esta pesquisa quando realizada a tempo permite a adoção de medidas de controlo de infeção, que levam a uma diminuição da probabilidade da transmissão a toda a Unidade de Saúde.

De modo atingir estes objetivos, no laboratório são utilizadas metodologias e equipamentos avançados para uma resposta mais atualizada e precisa.

Todos os procedimentos laboratoriais estão sujeitos a uma garantia de qualidade quer interno e externo. No laboratório Avelab o controlo de qualidade interno avalia os meios de cultura, os reagentes e a solução fisiológica usada nas suspensões bacterianas. O CQI utiliza estirpes ATCC (American Type Culture Collection) de forma a garantir a precisão e exatidão na execução dos testes de identificação bacteriana e dos seus respetivos testes de suscetibilidade antimicrobiana. Este setor participa regularmente num programa de avaliação externa da qualidade, nomeadamente o UK NEQAS. Os controlos enviados para serem testados são tratados como uma amostra normal, pois o seu conteúdo não é revelado. Estes incluem controlos com espécies desconhecidas de bactérias ou fungos de modo a realizar a sua identificação e avaliar a respetiva significância clínica. Também incluem espécies de bactérias conhecidas com o objetivo de determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos indicados. Todos os controlos são acompanhados com a respetiva informação clínica. Posteriormente, são enviados os resultados à entidade externa para avaliar a qualidade dos mesmos.

7.1. Triagem Microbiologia

No setor da Microbiologia do Laboratório Avelab, chegam vários tipos de amostras para análises bacteriológicas, parasitológicas e micológicas, como amostras de fezes, urina, expectoração, exsudados uretrais, exsudados retais, exsudados vaginais, exsudados purulentos, exsudados nasofaríngeos, fragmentos de unhas, entre outros. Neste setor ainda se realiza a análise do espermograma.

As amostras com maior taxa de análise diária são de urina para a realização de exames bacteriológicos e sumária de urina. Estes exames são de extrema importância na detecção e diagnóstico de infecções do trato urinário.

Antes das amostras serem triadas e processadas passam por uma seleção a nível macroscópico, onde se visualiza os recipientes para onde a amostra foi colhida, a sua identificação e se contém volume suficiente. Caso falhe algum destes parâmetros, a amostra é rejeitada e pede-se uma nova colheita. Após esta seleção, as amostras dão entrada no sistema Apollo e, de seguida as análises requeridas são processadas.

No caso de a amostra ser urina, esta é encaminhada para outros setores dependendo da análise prescrita. Contudo, as restantes amostras ficam no setor da Microbiologia onde são processadas.

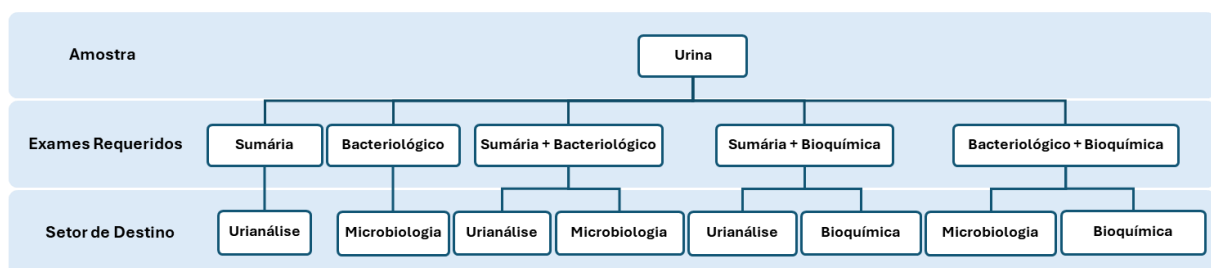


Figura 5: Análises requeridas com os setores a que se destina.

7.2. Equipamentos Automatizados

No setor da Microbiologia existem variados equipamentos automatizados como o Unamax, Sedimax e o Vitek 2 Compact. Também existe equipamentos como centrífugas, estufas, microscópicos e câmaras de fluxo laminar.

7.2.1. Unamax e Sedimax

O exame sumário de urina é realizado no equipamento automatizado UNAMAX, fabricado pela Menarinidiag (Figura 5), que está conectado fisicamente e através de software com o analisador de sedimentos de urina com contraste de fase e campo claro, o equipamento automatizado sediMAX conTRUST, do mesmo fabricante do equipamento acima mencionado (Figura 6). A combinação do UNAMAX com o sediMAX conTRUST cria uma boa estação de trabalho de urinálise, melhorando o rendimento e aumentando a precisão analítica em um ambiente de rotina.

O UNAMAX através de tiras teste analisa diversos parâmetros, nomeadamente a cor, turvação, gravidade específica, pH, e ainda a presença de urobilinogénio, bilirrubina, cetonas, glicose, nitrito, sangue, proteínas, leucócitos, ácido ascarbónico, microalbumina, creatinina, cálcio e albumina para creatinina.

O sediMAX conTRUST utiliza a metodologia de microscopia digital de campo total, através de um microscópio digital, uma câmara incorporada e um software de processamento de imagem. Este permite identificar e classificar um largo espectro de partículas, executar uma contagem em cada amostra e, ainda fornecer uma interpretação global dos resultados. As imagens visualizadas no écran são idênticas às observadas através de um microscópio tradicional facultando imagens de campos completos da amostra. Desta forma, o sediMAX conTRUST é capaz de contar e identificar hemácias, leucócitos, células epiteliais, leveduras, bactérias, diversos tipos de cristais e cilindros patológicos. (29)



Figura 6: Equipamento UNAMAX (Adaptado de <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/diagn%C3%B3stico-profissional/urina%C3%A1lise/unamax/multimedia>)



Figura 7: Equipamento sediMAX conTRUST (Adaptado de <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/menarini-diagnostics/product-79119-830424.html>)

7.2.2. Vitek 2 Compact

O Vitek 2 Compact é um equipamento automatizado da Biomérieux que permite através da precisão e rapidez, a identificação de isolados microrganismos e a deteção de diversas resistências antimicrobianas devido ao seu sistema colorimétrico. (30)

A reatividade ao Gram ajuda a dirigir e seleccionar os testes necessários a serem realizados no equipamento Vitek 2 Compact.

Este equipamento tem como base a microdiluição em caldo que utiliza cartas de plástico de 64 poços que contém 17 a 20 agentes antimicrobianos. Combinações de cartas de suscetibilidade podem ser feitas com extensão de cartas de suscetibilidade, resultando no teste de 18 a 19 agentes antimicrobianos adicionais no mesmo isolado. O Vitek 2 Compact mede alterações na turbidez ao longo do tempo (curva de crescimento), comparando o poço de controlo de crescimento com os poços que contém várias concentrações de antibiótico. (31)

No laboratório as cartas de identificação podem ser utilizadas em combinação com as cartas de TSA ou cada uma pode ser utilizada separadamente consoante o objetivo da análise.

Como referido anteriormente, o Vitek 2 Compact através de mudanças contínuas no indicador bem como da turvação bacteriana, determina a presença ou ausência de crescimento bacteriano. De acordo com o microrganismo identificado, o Vitek 2 Compact indica as sensibilidades ou resistências aos antibióticos entre 8 a 18h. Por fim, os resultados são validados pelos especialistas ou técnicos superiores.



Figura 8: Equipamento Vitek 2 Compact (Adaptado de <https://www.biomerieux-industry.com/pt/products/vitek-2-compact-identificacao-microbiana-de-rotina-para-aplicacoes-em-alimentos>)

Tabela 11: Cartas de identificação e de TSA utilizadas no Laboratório Avelab

Famílias	Carta	Turvação McFarland
<i>Enterobacterales</i>	AST-N355	0,50-0,63
<i>Pseudomonas e Acinetobacter</i>	AST-N427	0,50-0,63
Bacilos Gram-negativos multiresistentes	AST-XN22	0,50-0,63
<i>Staphylococcus spp.</i>	AST-P648	0,50-0,63
<i>Enterococcus spp. e Streptococcus agalactiae</i>	AST-P586	0,50-0,63
<i>Streptococcus pneumoniae, Streptococcus beta-hemolíticos e Streptococcus do grupo viridans</i>	AST-ST03	0,50-0,63
Bacilos Gram-negativos	GN	0,50-0,63
Microrganismos Gram-positivos	GP	0,50-0,63
<i>Haemophilus, Neisseria, Campylobacter, Moraxellae</i> outros microrganismos fastidiosos	NH	2,70-3,30
Leveduras e microrganismos similares de relevância clínica	YST	1,80-2,20

7.3. Métodos de Coloração

7.3.1. Coloração de Gram

Nos laboratórios de Microbiologia é realizado inúmeras vezes a coloração de Gram, uma vez que orienta os processos de diagnóstico e terapêutico de infecções bacterianas. Esta coloração permite distinguir bactérias Gram-positivas de bactérias Gram-negativas bem como a sua morfologia (cocos ou bacilos) e o tipo de agrupamento (cocos, diplococos, estreptococos, estafilococos, bacilos, cocobacilos, diplobacilos e estreptobacilos), devido à cor que estas adquirem após serem coradas. (32)

A diferença na composição entre as paredes das bactérias Gram-positivas e as paredes das Gram-negativas origina as diferenças da coloração de Gram entre estes dois grupos principais de bactérias.

As bactérias Gram-negativas possuem uma parede de peptidoglicano fina, isto é, um polímero constituído por açúcares e aminoácidos que formam uma malha na região exterior à membrana celular das bactérias. Desta forma, o corante violeta de cristal é facilmente removido pelo descorante (álcool-acetona) nas bactérias Gram-negativas e estas coram com o corante de contraste. Assim, estas bactérias ficam coradas de vermelho no fim do processo.

Já as bactérias Gram-positivas, devido à espessa camada de peptidoglicano, permite reter o corante básico (violeta de cristal) e resistirem à descoloração. Embora o corante de contraste possa ser absorvido pelas bactérias Gram-positivas, a sua aparência púrpura não é alterada.

No Laboratório de estágio usa-se o equipamento automatizado AeroSpray® Gram Slide Stainer / Cytocentrifuge. A vantagem do uso deste equipamento não é só a nível económico como o gasto de reagentes é inferior em comparação ao método manual, mas também, a qualidade das lâminas coradas, uma vez que o sistema de coloração automatizado utiliza padrões, que aumenta a comparabilidade e consistência dos resultados enquanto manualmente depende das competências do técnico de laboratório. (33)

Esta tecnologia de spray requer baixa manutenção e elimina ainda a contaminação cruzada.

Após a coloração, estes esfregaços são observados ao microscópio ótico de campo claro na objetiva de imersão (100x).



Figura 9: Equipamento AeroSpray® Gram Slide Stainer / Cytocentrifuge (Adaptado de <https://aerospraystaining.com/gram.php>)

7.3.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

Esta coloração é usada especificamente para um subconjunto de bactérias cujas paredes celulares contêm ácidos micólicos, o que torna estas resistentes à descoloração álcool-ácido. As micobactérias são as bactérias mais vulgarmente encontradas com esta característica, como por exemplo, a *Mycobacterium tuberculosis*. As bactérias que não possuem paredes celulares com ácidos micólicos não resistem à descoloração com álcool-ácido, sendo uma característica da maioria das outras bactérias clinicamente revelantes.

Estas bactérias são conhecidas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

Após a fixação do esfregaço, toda a lâmina ficará colorida de azul, exceto BAAR, que estará a rosa. (34)

7.3.3. Coloração de Azul de Lactofenol

A coloração de azul de lactofenol permite corar células fúngicas utilizando lactofenol azul de algodão em amostras de cabelos, pêlos, escamas de pele e unhas. Desta forma, o azul de metila cora a quitina nas paredes celulares do fungo com azul brilhante e, o lactofenol atua como montante. (34)

7.4. Meios de Cultura

Os meios de cultura proporcionam condições ótimas para o crescimento dos agentes patogênicos vulgarmente encontrados num tipo de amostra. Estes permitem o crescimento, o isolamento, a identificação e a caracterização dos microrganismos presentes na amostra clínica. Além disso, os meios de cultura possibilitam diferenciar entre os microrganismos mais propensos de causar infecção e os prováveis colonizadores ou contaminantes. A escolha dos meios de cultura depende dos microrganismos que se pretendem identificar numa determinada amostra.

Os meios de cultura podem ser sólidos ou líquidos. Nos meios líquidos ocorre a turbacão do meio e uma melhor difusão de metabolitos em contrapartida, nos meios sólidos observa-se o crescimento bacteriano devido ao consumo dos nutrientes.

Após a inoculação da amostra no respetivo meio de cultura, o crescimento bacteriano é influenciado por vários fatores, bem como, a temperatura, a humidade e a percentagem de CO₂. A maioria das bactérias em estudo são incubadas a 35±2°C durante 18–24h.

No laboratório Avelab, as placas inoculadas são incubadas em atmosfera de aerobiose numa estufa a 36°C. Contudo, existe exceções, tais como, a incubação de espécies fastidiosas a uma atmosfera de 5–10% de CO₂ (*Streptococcus pneumoniae* ou *Neisseria gonorrhoeae*).

No laboratório de estágio utilizam-se diferentes meios, meios seletivos que permite o crescimento de um tipo de microrganismos e inibem o crescimento de outros; meios não seletivos não contêm substâncias antimicrobianas ou químicos inibidores de crescimento e possuem nutrientes que suportam o crescimento da maioria dos microrganismos não fastidiosos; meios de enriquecimento contêm composição química rica em nutrientes com a finalidade do aumento em número da bactéria; meios diferenciais contêm componentes que

diferenciam os microrganismos através da mudança de coloração ou mudança da morfologia das colónias por reações bioquímicas.

7.4.1. Características dos meios utilizados no Laboratório Avelab

CHROMagar orientation

Meio cromogénico permite a identificação de bactérias e leveduras ou grupos de microrganismos, sem testes adicionais ou com um número mínimo de testes de confirmação.
(35)

Gelose de sangue

Meio enriquecido e diferencial, permite a deteção de microrganismos fastidiosos, bem como a deteção de hemólise.

Salmonella–Shigella agar (SS)

Meio seletivo e diferencial, permite isolar *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

Gelose de chocolate (PVX)

Meio enriquecido e não seletivo, favorece o crescimento e isolamento de *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp.

Gelose Cistina–Lactose–Deficiente em Eletrólitos (CLED)

Meio diferencial e não seletivo, isola microrganismos do trato urinário assim como permite a sua contagem e diferenciação.

Manitol salgado

Meio seletivo utilizado para isolamento seletivo de estafilococos.

Gelose Mueller–Hinton

Meio sólido, não seletivo, usado no estudo da sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco.

Candiselect

Meio diferencial e seletivo, isola leveduras. Identifica a espécie *Candida albicans* e diferencia outras espécies como *Candida tropicalis* e *C. krusei*.

Gelose Campyloset

Meio seletivo, isola *Campylobacter* spp. em amostras de fezes.

Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol

Meio seletivo, isola fungos filamentosos e leveduras.

Gelose MacConkey

Meio seletivo e diferencial para isolamento de bacilos Gram-negativos. Por exemplo, *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. etc.

7.5. Provas de Identificação Bacteriana

Após a incubação dos meios de cultura durante 18–24h são analisadas características macroscópicas das colónias bacterianas. No exame cultural, as colónias isoladas devem ser avaliadas em relação a cor, forma, dimensão, elevação, margem, superfície, consistência, produção de pigmento e odor.

Quando não há crescimento bacteriano, as culturas são incubadas por mais 24h, uma vez que existe bactérias com crescimento mais lento, isto é, requerem mais tempo de incubação, aproximadamente 48h.

No caso dos fungos filamentosos, o seu tempo de incubação é de 21 a 30 dias a 30°C.

A prova bioquímica manual tem como objetivo auxiliar na identificação de bactérias nos meios de cultura onde não há diferenciação das espécies em estudo.

7.5.1. Provas bioquímicas realizadas no Laboratório Avelab

Teste do Indol

Teste bioquímico que determina a capacidade de as bactérias converterem triptofano em indol, através de uma reação de desaminação.

No laboratório Avelab usa-se o reagente de Kovács, método mais utilizado para deteção de bactérias produtoras de indol. Desta forma, numa reação positiva há formação de um anel de coloração rosa na superfície do meio, como por exemplo na *Escherichia coli*. Numa reação negativa, não há mudança de cor, fica com coloração amarela, uma vez que o triptofano não é hidrolisado, como exemplo tem-se o *Pseudomonas aeruginosa*. (36)

Teste da Coagulase

Teste de aglutinação em lâmina para identificar se a bactéria é produtora da enzima coagulase. Esta enzima reage com um cofator que existe no plasma de algumas espécies, e desta forma, há formação de um coágulo perante um resultado positivo, por exemplo *Staphylococcus aureus*, apresenta coagulase positiva. (37)

No laboratório Avelab, utiliza-se o teste comercial Pastorex STAPH-PLUS da Bio-Rad. Caracteriza-se por ser um teste de aglutinação em látex para identificação de *S. aureus* através da deteção simultânea da coagulase (fator de aglutinação), proteína A e polissacarídeos capsulares. (34)

Teste da Catalase

Teste bioquímico para determinar a capacidade das bactérias de produzir a enzima catalase. Esta enzima decompõe o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigénio (O_2). As bactérias são catalase positiva se existir formação de bolhas de oxigénio quando uma pequena suspensão bacteriana é adicionada ao peróxido de hidrogénio, por exemplo *Staphylococcus aureus*. Já o *Streptococcus agalactiae* apresenta catalase negativa. (38)

Teste da Oxidase

Teste para deteção da enzima citocromo oxidase. Este distingue as bactérias não fermentadoras (oxidase positiva) das fermentadoras (oxidase negativa).

O teste é realizado em tiras reagentes, para diferenciar os grupos de bactérias Gram-negativas, quando a tira fica neutra, considera-se resultado negativo. Num resultado positivo, há uma mudança de cor para roxo, ou seja, a tira fica oxidada uma vez que o dador de eletrões é oxidado pelo citocromo oxidase.

Um exemplo de bactérias com oxidase positiva é *Pseudomonas aeruginosa*, em contrapartida a *Escherichia coli* tem oxidase negativa. (38)

7.6. Método de Difusão em Disco

O método de difusão em disco também conhecido como método de Kirby-Bauer, é um método de rotina de teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA). Uma desvantagem deste método é ser relativamente lento, contudo é confiável, simples e com baixos custos. Tem como objetivo medir a suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos.

Em primeiro lugar, a partir da bactéria identificada são escolhidos os discos de antibiótico a utilizar. De seguida, uma colónia pura é suspensa em solução salina até atingir uma turvação de 0,5 Mc Farland. Posteriormente, a suspensão bacteriana é inoculada através da técnica de sementeira em toalha em ágar de Mueller-Hilton e, são colocados os discos impregnados de antibiótico. Este é incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18–24h. (39)

O antibiótico difunde para o meio em gradiente de concentração até ocorrer a formação de um círculo em torno do disco que indica que a bactéria atingiu a concentração de antibiótico que inibe o seu crescimento.

Por fim, são medidos os diâmetros nas zonas de inibição em torno de cada disco (onde não há crescimento de microrganismos). Cada combinação de organismo-antibiótico possui diferentes diâmetros, que significa sensível (S), sensível com maior exposição (I) e resistente (R). Estes valores obtidos são comparados com os valores de referência das tabelas do EUCAST para assim determinar as sensibilidades e resistências aos antibióticos.

No laboratório Avelab, a maior parte dos TSA são realizados no VITEK 2 Compact. O método de difusão em disco é um método manual que em determinadas situações também é recorrido. Apenas não existe opção no Vitek para microrganismos fastidiosos como *Haemophilus influenzae*. Neste caso particular, utiliza-se o meio Mueller Hinton + 5% Sangue de cavalo + 20mg/l β -NAD* (MHF).

7.7. Principais Produtos Biológicos do Laboratório

Neste subcapítulo são abordados os procedimentos de rotina para cada tipo de amostra biológica realizados no laboratório de Microbiologia do Avelab. Desta maneira, são apresentados exemplos de casos clínicos e, sempre que possível com as respetivas imagens dos resultados. De frisar que por motivos de privacidade, os nomes e números mecanográficos dos utentes não são mencionados.

7.7.1. Urina

Um das infecções mais comuns na sociedade é a infecção do trato urinário (ITU). Esta tem maior taxa de incidência em mulheres, uma vez que a uretra feminina é anatomicamente mais curta em relação à uretra masculina, favorecendo a migração de bactérias provenientes do ânus.

No entanto, existem fatores externos responsáveis pela ITU como a toma da pílula anticoncepcional, gravidez, cateterização da bexiga, imunidade comprometida, entre outros. (12)

O diagnóstico clínico da ITU depende dos sintomas, da análise sumária da urina e da urocultura, sendo que nestes dois últimos testes, o laboratório desempenha um papel muito importante. (34)

A realização da análise sumária da urina compreende dois procedimentos, a análise da urina não centrifugada e a análise microscópica a fresco do sedimento urinário da urina centrifugada. A primeira, efetua-se através de uma tira-teste, onde se analisam parâmetros como nitritos, leucócitos, pH, eritrócitos, proteínas, glucose, entre outros. Já a análise microscópica a fresco do sedimento urinário de urina centrifugada permite a observação ou não de bactérias, células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e cristais. Na obstante desta análise avaliar parâmetros da área da Bioquímica, realiza-se no laboratório de Microbiologia da Avelab e, por isso, encontra-se descrito neste subcapítulo a sua importância.

Colheita

A maioria das colheitas de urina são realizadas pelo utente através de métodos não invasivos, como é o caso da técnica de jato intermédio de urina. Desta forma, é extremamente importante a transmissão de instruções corretas por parte do técnico para o utente, sobre a colheita.

De modo a garantir a qualidade dos exames a serem executados, o laboratório Avelab definiu critérios específicos para a colheita e transporte de urinas, tais como: a colheita deve ser realizada para um frasco esterilizado; amostras de urina colhidas há mais de 2 horas devem de ser refrigeradas; o recipiente deve estar devidamente identificado, acondicionado e não vertido; o volume mínimo de urina recomendado é de 10 mL para os adultos e 5 mL para as crianças; em doentes algaliados, a urina não deve ser colhida dos sacos coletores mas sim através de métodos invasivos como a colheita suprapúbica. Caso algum destes requisitos não seja cumprido, a amostra poderá ser rejeitada.

Uma consequência de uma má colheita de urina é o aparecimento de três ou mais microrganismos na urocultura e, nestes casos, não tem qualquer significado clínico visto que

estamos perante uma flora polimicrobiana. Assim, para um diagnóstico laboratorial fidedigno é importante por parte do profissional de saúde a diferenciação entre contaminação e infeção.

Caso Clínico

Como referido anteriormente, as urinas com requisição de sumária de urina e urocultura são analisadas, primeiramente, no equipamento automatizado UNAMAX. Caso o equipamento não detete sinal de infeção, ou seja, não existir alteração de nenhum parâmetro sugestivo de infeção, a amostra é arquivada e o resultado é dado como negativo. Se o aparelho detetar alteração de parâmetros pode-se estar perante possível infeção e, nesse caso, a amostra é centrifugada durante 10 minutos a 20 rotações por minuto (rpm) e prossegue para análise de sedimento urinário, isto é, visualização ao microscópico do sedimento urinário.

Durante o estágio no laboratório Avelab, foi possível participar no processamento de várias amostras. Um dos casos pertencia a um individuo do sexo masculino, com 70 anos de idade. Na requisição médica pedia-se sumária de urina e exame bacteriológico.

A amostra foi primeiramente triada para dar entrada no sistema Apollo e, de seguida, foi colocada uma alíquota da amostra de urina no equipamento UNAMAX e detetou-se uma possível infeção. Posteriormente, a urina foi centrifugada e analisou-se microscopicamente o sedimento urinário numa ampliação de 40x onde se observou 5-10 células epiteliais normais e de transição, leucócitos >200, bacilos negativos e positivos. Não foram observados cristais, fungos ou parasitas, nem eritrócitos.

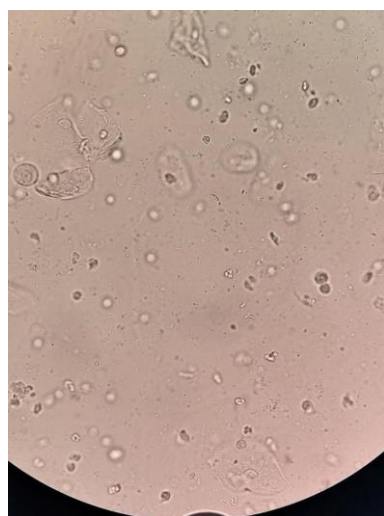


Figura 10: Observação microscópica do sedimento urinário.

De seguida, realizou-se uma coloração de Gram onde se observaram Bacilos negativos, Bacilos positivos, células epiteliais e leucócitos. Não foram observados parasitas, cristais ou fungos. A quantificação dos microrganismos foi registada na folha de trabalho que acompanha a amostra.

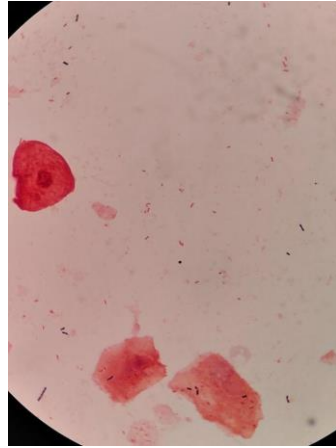


Figura 11: Visualização microscópica da coloração de Gram

Posteriormente, a urina foi semeada com o auxílio de uma ansa de 1-10 ul, em meio de cultura CHROMagar Orientation (que é utilizado para a maioria das bactérias encontradas na urina). O meio de cultura foi incubado a 36°C durante 18-24 horas.

No fim do período de incubação procedeu-se à observação e análise do meio de cultura, onde se observou colónias grandes e arroxeadas.



Figura 12: Colónias *E. coli* em meio de CHROMagar Orientation.

De acordo com a informação reunida, deduziu-se ser uma infeção por uma bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli*. Considerou-se a cultura positiva visto que têm um microrganismo com mais de 10^5 UFC/mL.

De notar que toda a informação foi anotada na folha de trabalho do utente durante todo o processamento da amostra, para que não exista perda de informação.

Por fim, foi preparado o painel para teste automatizado de identificação e TSA adequado para o tipo de microrganismo que foi observado. O equipamento Vitek 2 Compact confirmou a identificação realizada anteriormente, bem como determinou a suscetibilidade aos antibióticos.

7.7.2. Fezes

O trato gastrointestinal Humano é colonizado por inúmeros microrganismos da família Enterobacteriaceae (bacilos Gram-negativos). Apesar da *Escherichia coli* colonizar o intestino humano, algumas das suas estirpes como a *E. coli* enterotoxigénica são prejudiciais para o hospedeiro. Em contrapartida, espécies como a *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. não fazem parte da flora intestinal e, dessa forma, a sua presença constitui um perfil patológico. A infeção por parte destas bactérias patogénicas ocorre através de ingestão de alimentos e águas contaminadas. (34)

As gastroenterites são maioritariamente causadas por agentes bacterianos, no entanto, também podem estar envolvidos parasitas, fungos e vírus na sua causa. Deste modo, é essencial a realização de exames micológicos, parasitológicos e coproculturas em amostras de fezes a fim de identificar o agente etiológico da doença, mas também para direcionar a terapêutica através da realização de TSA.

Colheita

O utente deve defecar para um recipiente limpo, seco e recolher com a ajuda de uma espátula uma pequena porção de fezes (aproximadamente do tamanho de uma noz) para um frasco estéril. O frasco deve ser hermeticamente fechado e entregue no laboratório o mais rápido possível a fim de a amostra ser processada. Caso a entrega imediata não seja possível, o utente deve conservar as fezes entre 2°C a 8°C até 24 horas.

Se for pedido pelo médico mais que uma amostra, estas devem ser colhidas em dias diferentes.

Caso clínico

Este caso clínico diz respeito a um exame parasitológico de fezes de um utente do sexo masculino com 54 anos.

Uma vez que a amostra de fezes se encontrava nas condições apropriadas de transporte e acondicionamento, foi possível realizar a preparação a fresco da amostra de fezes, onde se observou ao microscópio ótico a presença de quistos de *Entamoeba coli*. Este é um protozoário não patogénico ao nível do trato intestinal, com distribuição global. A sua transmissão ocorre por contacto fecal-oral e, normalmente, os quistos maduros podem ser ingeridos em fontes de água e alimentos contaminados.

Na Figura 13 observa-se o quisto de *Entamoeba coli* de forma esférica, parede espessa fortemente refrigente, cinco núcleos, cromatina periférica grossa e irregular, corpos cromatóides em forma de agulha, conteúdo hialino e cariossoma excêntrico.



Figura 13: Imagem retirada do Laboratório Avelab de Quistos de *Entamoeba coli*

7.7.3. Exsudados Vaginais

As infeções vaginais podem ser provocadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos.

Fatores como sistema imune deprimido, alteração do pH e a idade podem provocar alteração das bactérias presentes na microbiota vaginal e, conseqüentemente, causar infeção.

Este desequilíbrio da microbiota vaginal pode provocar vaginose bacteriana. Esta caracteriza-se pela diminuição de *Lactobacillus* (bactérias pertencentes à microbiota), que leva ao aumento do pH da mucosa vaginal, permitindo que outro tipo de bactérias prolifere em excesso.

Nos exsudados vaginais é realizado um exame bacteriológico, micológico e parasitológico (BPM). Este tem como objetivo diagnosticar vaginites. Esta patologia pode ser provocada por parasita

(*Trichomonas vaginalis* – parasita mais comum), bactéria (*Gardnerella vaginalis* – bactéria mais comum) ou fungo (*Candida albicans* – fungo mais comum). No entanto são pesquisadas e avaliadas outras bactérias como cocos Gram-positivos em cadeia, cocos Gram-positivos em cacho, bacilos Gram-negativos e diplococos.

Colheita

Apenas os profissionais de saúde ou técnicos de análises clínicas podem realizar a colheita de um exsudado vaginal.

O utente deve efetuar uma higienização da área com água e sabão, sem uso de antissépticos ou antimicrobianos, de maneira que o ambiente microbiano seja protegido a fim de um melhor diagnóstico.

O exsudado vaginal é colhido com o auxílio de uma zaragatoa, fazendo uso de movimentos circulares nas paredes da mucosa vaginal. A zaragatoa é colocada num recipiente estéril com meio de conservação apropriados.

Caso Clínico

Este caso clínico diz respeito a um exame BPM, em exsudado vaginal de uma utente de 28 anos do sexo feminino.

Primeiramente, foi observado ao microscópico ótico uma preparação a fresco, na qual se notou alguns leucócitos e numerosas células epiteliais de descamação (clue cells). Deste modo, foi efetuado uma coloração de Gram, conforme a figura 14, onde foram observados numerosos cocobacilos Gram-negativos.

Caso a amostra apresentasse bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos era fundamental a realização do exame cultural visto serem microrganismos com morfologias revelantes. Contudo, como neste caso clínico só foram visualizados cocobacilos Gram-negativos não foi necessário a realização do exame cultural.

Se tivessem sido observados fungos filamentosos e leveduras era imprescindível a realização do exame cultural em meio Saboraud e, em gelose de chocolate PVX caso se observasse diplococos.

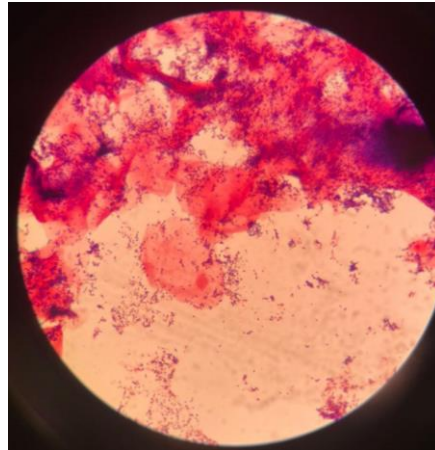


Figura 14: Coloração de Gram de um BPM vaginal no laboratório Avelab.

A presença de bactérias com morfologia de cocobacilos Gram-negativos dispostas em clue cells, isto é, células epiteliais de descamação cobertas por bastonetes Gram-negativos aderentes é indicativo de uma vaginose bacteriana. A presença de numerosos leucócitos e raros lactobacilos indicam infecção provocada por *Gardnerella vaginalis*. No entanto, por não existirem estruturas fúngicas e parasitárias pode-se concluir que *Gardnerella vaginalis* seria a origem da infecção em questão.

7.8. Validação Médica no Setor Microbiologia

No fim de se processar as amostras, o aparelho Vitek 2 Compact transmite automaticamente os resultados dos testes da sensibilidade aos antibióticos. Todos os restantes resultados são inseridos no sistema Apollo manualmente.

Ao aparecer algum resultado mais crítico, este é imediatamente reportado ao utente. Um exemplo destes casos é a deteção de *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases. Os mecanismos de resistência aos carbapenemos relacionados às carbapenemases são em sua maioria codificados por plasmídeos, tornando-os altamente transferíveis, pelo menos dentro das espécies de *Enterobacterales* e, portanto, potencialmente responsáveis por surtos. Estes também estão significativamente associados à resistência multimedamentosa e a outras famílias de antibióticos. Desta forma, constituem uma séria ameaça para a saúde pública, uma vez que tem capacidade de se adaptarem ao meio e, deste modo, criar novas resistências contra os antibióticos.

8. Conclusão

Com o término do estágio curricular posso retirar várias conclusões de grande importância para o meu futuro profissional.

Durante a realização do mesmo tive a oportunidade de colocar em prática os conhecimentos teóricos e práticos que adquiri ao longo da Licenciatura em Ciências Biomédicas e no presente Mestrado. Permitiu-me também valorizar a nível pessoal e profissional, possibilitando experiência real em contexto de laboratório. Desenvolvi a minha autonomia e o meu espírito crítico na tomada de decisões face a problemas que surjam em contexto laboratorial, mas também aprendi o que é trabalhar em equipa com o objetivo de prestar o melhor serviço possível. No laboratório Avelab existe um elevado rigor científico na execução de inúmeros procedimentos laboratoriais, mas também dos técnicos que os executam.

No decorrer do estágio tive a oportunidade de manusear amostras biológicas, participar no controlo e calibração dos equipamentos, a fim de minimizar erros. Desta forma, é necessária uma interligação de conhecimentos de todas as áreas, para que se possa ter uma visão geral do estado de saúde de cada utente, de modo que a validação dos resultados não apresente nenhuma não conformidade. Apesar de ter sido uma experiência enriquecedora, considero que poderia ter contactado mais com a fase de validação de resultados, visto ter sido uma área que me suscitou bastante interesse e julgo ser importante para o futuro.

Quero também, enaltecer a boa integração nos grupos de trabalho onde estive inserida, a disponibilidade na transmissão de conhecimentos e a simpatia dos profissionais de saúde com que contactei. Foi sem dúvida uma experiência de trabalho exigente devido à quantidade e multiplicidade de tarefas que se realizam diariamente, contudo também me fez perceber que é esta a área que pretendo seguir futuramente.

Para concluir, adquiri excelentes conhecimentos e, considero-me preparada para o mercado de trabalho de modo a ser uma boa profissional na área da saúde.

Agradeço a todos os que me acompanharam.

Referências Bibliográficas

1. Seo J Do, Song DY, Nam Y, Li C, Kim S, Lee JH, et al. Evaluation of analytical performance of Alinity i system on 31 measurands. *Pract Lab Med* [Internet]. 2020;22(June):e00185. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2020.e00185>
2. Njoroge SW, Nichols JH. Risk Management in the Clinical Laboratory. *Ann Lab Med* [Internet]. 2014 Jul 1;34(4):274–8. Available from: <http://annlabmed.org/journal/view.html?doi=10.3343/alm.2014.34.4.274>
3. Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2009 Jun;404(1):16–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2009.03.022>
4. Hammerling JA. A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today: Table 1. *Lab Med* [Internet]. 2012 Feb 1;43(2):41–4. Available from: <https://academic.oup.com/labmed/article-lookup/doi/10.1309/LM6ER9WJR1IHQAUY>
5. Keel BA. Quality Control, Quality Assurance, and Proficiency Testing in the Andrology Laboratory. *Arch Androl* [Internet]. 2002 Jan 9;48(6):417–31. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01485010290099147>
6. Almeida CMC de. Controlo de Qualidade Interno: Elaboração de um programa de Controlo de Qualidade Interno segundo as boas práticas da Qualidade [Internet]. Universidade Atlântica e pela Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa. Universidade Nova de Lisboa– Faculdade de Ciências Médicas e Universidade Atlântica– Escola Superior de Saúde; 2013. Available from: <https://run.unl.pt/handle/10362/10307>
7. Bowen RAR, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Medica* [Internet]. 2014;24(1):31–44. Available from: <http://www.biochemia-medica.com/en/journal/24/1/10.11613/BM.2014.006>
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology* [Internet]. Vol. 8, Elsevier. 2016. 1–943 p. Available from: <https://sciencescholar.us/journal/index.php/ijhs/article/view/8299>
9. Kanani FZ, Haider Kazmi A, Kaleem B. Sigma metrics of Alinity ci system – a study on thirty-nine clinical chemistry and immunoassay parameters. *Adv Lab Med / Av en Med Lab* [Internet]. 2021 May 20;2(2):267–75. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/almed-2021-0001/html>
10. Pinto APMMO. Desenvolvimento De Um Sistema De Detecção Potenciométrico

- Diferencial Para a Determinação Por Fia Do Teor De Azoto Total Em Alimentos E Águas [Internet]. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 1997. Available from: https://catalogo.up.pt/F/?func=direct&doc_number=000095018&local_base=UPB01
11. Oliveira MVP de. Aplicações De Estudos Bioquímicos Quantitativos Em Ciências Biológicas E Da Saúde. Faculdade Araguaia- Goiânia. 2012.
 12. Shankar PR, Alshakka MA. Clinical Pharmacy and Therapeutics Sixth Edition. J Chitwan Med Coll [Internet]. 2019 Sep 25;9(3):104–104. Available from: <https://www.nepjol.info/index.php/JCMC/article/view/25793>
 13. Balarin MRS, Lopes RS, Kohayagawa A, Laposy CB, Fontequé JH. Assessement of glycaemia and serum activities of aspartate aminotransferase , creatinekinase , gamma glutamyltransferase and lactate dehydrogenase in thoroughbred horses submitted to exercise of different intensities. Semin Ciências Agrárias [Internet]. 2005;26(2):211–8. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744076010>
 14. Sung PS. A different detection method reveals a new role of alanine aminotransferase as an indicator of liver fibrosis. Korean J Intern Med [Internet]. 2020 Mar 1;35(2):295–7. Available from: <http://kjim.org/journal/view.php?doi=10.3904/kjim.2020.050>
 15. Makris K, Mousa C, Cavalier E. Alkaline Phosphatases: Biochemistry, Functions, and Measurement. Calcif Tissue Int [Internet]. 2022 Dec 26;112(2):233–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00223-022-01048-x>
 16. Sánchez Rodríguez, J, Soriano Suárez E, Girona Bastús R, Pérez Muñoz P, Viñets Gelada C. ¿Por qué aumentan las fosfatasas alcalinas? Atención Primaria [Internet]. 2002;29(4):241–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0212-6567\(02\)70552-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0212-6567(02)70552-0)
 17. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature [Internet]. 2007 Oct 17;449(7164):819–26. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature06246>
 18. Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. Int J Biomed Sci [Internet]. 2006 Sep 15;2(3):217–35. Available from: <https://ijbs.org/User/ContentFullTextFrame.aspx?VolumeNO=2&StartPage=217>
 19. García-Campaña AM, Baeyens WRG. Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. Analisis [Internet]. 2000 Oct;28(8):686–98. Available from:

- <http://analisis.edpsciences.org/10.1051/analisis:2000280686>
20. Ashi A, Al-Hajeili M, Almaghrabi S, Al-Maghrabi J, Trabulsi N, Alghuraibi S, et al. Prevalence of CEA, CA 125, and CA 15-3 serum tumour markers in different regions of Saudi Arabia. *Saudi Med J* [Internet]. 2024 Jun 2;45(6):565–71. Available from: <https://smj.org.sa/lookup/doi/10.15537/smj.2024.45.6.20230878>
 21. Almeida JRC de, Pedrosa N de L, Leite JB, Fleming TR do P, Carvalho VH de, Cardoso A de AA. Marcadores Tumoriais: Revisão de Literatura. *Am Print*. 2007;53(MAR.):305–16.
 22. PARRA-ROBERT M, SANTOS VM, CANIS SM, PLA XF, FRADERA JMA, PORTO RM. Relationship Between CA 19.9 and the Lewis Phenotype: Options to Improve Diagnostic Efficiency. *Anticancer Res* [Internet]. 2018 Oct 1;38(10):5883–8. Available from: <http://ar.iijournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.12931>
 23. Molina V, Visa L, Conill C, Navarro S, Escudero JM, Auge JM, et al. CA 19-9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer. *Tumor Biol* [Internet]. 2012 Jun 29;33(3):799–807. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-011-0297-8>
 24. Marinescu MC, Oprea VD, Munteanu SN, Nechita A, Tutunaru D, Nechita LC, et al. Carbohydrate Antigen 125 (CA 125): A Novel Biomarker in Acute Heart Failure. *Diagnostics* [Internet]. 2024 Apr 10;14(8):795. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/14/8/795>
 25. Grilo MCA, Oliveira MAPM, Rosa AFM, Sousa NMA. Papel do antígeno específico da próstata no rastreio do carcinoma da próstata Carcinoma da próstata. *Acta Urológica* [Internet]. 2004;21(2):27–33. Available from: <https://hdl.handle.net/10316/14385>
 26. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2006 Nov 1;43(9):1143–51. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/43/9/1143/425223>
 27. Costa FAS, Quadrado AVM, Brandão AP, Leme BAP, Carneiro BV, Castanho DLM, et al. Síndrome da Rubéola Congênita: revisão de literatura. *Rev Med e Saúde Brasília* [Internet]. 2013;2(1):46–57. Available from: <https://portalrevistas.ucb.br/index.php/rmsbr/article/view/3895>
 28. Mustafa KM, Mohammed AB, Mero WMS. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies and Associated Risk Factors Among Women in Zakho City, Iraq. *Cureus*

- [Internet]. 2024 Mar 17;16(3):129–35. Available from: <https://www.cureus.com/articles/235243-seroprevalence-of-toxoplasma-gondii-antibodies-and-associated-risk-factors-among-women-in-zakho-city-iraq>
29. Zaman Z, Fogazzi GB, Garigali G, Croci MD, Bayer G, Kráncz T. Urine sediment analysis: Analytical and diagnostic performance of sediMAX® – A new automated microscopy image-based urine sediment analyser. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010 Feb;411(3–4):147–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2009.10.018>
 30. Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, Kisanuki K, Shiohira CM. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2007 Jun;58(2):191–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889306005141>
 31. Alabi ED, Bindawa BL, Mzungu I, Adesoji AT. Characterization of selected multidrug-resistant bacteria from clinical and hospital environmental sources using Vitek 2 compact system. 2023;1–14. Available from: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2790096/v1>
 32. Iida R, Hashimoto K, Hirata K, Matsuoka K, Yokoyama S. Detection System of Gram Types for Bacteria from Gram Stained Smears Images. In: *Proceedings of the 9th International Conference on Pattern Recognition Applications and Methods* [Internet]. SCITEPRESS – Science and Technology Publications; 2020. p. 477–84. Available from: <http://www.scitepress.org/DigitalLibrary/Link.aspx?doi=10.5220/0008964404770484>
 33. Froböse NJ, Bjedov S, Schuler F, Kahl BC, Kampmeier S, Schaumburg F. Gram Staining: a Comparison of Two Automated Systems and Manual Staining. Ledebauer NA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Nov 18;58(12):1–6. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01914-20>
 34. Mahon CR, Lehman DC. *Textbook of diagnostic microbiology* [Internet]. sixth edit. Elsevier. Elsevier; 2019. 1057 p. Available from: <http://evolve.elsevier.com/Mahon/microbiology/>
 35. Manickam K, Karlowsky JA, Adam H, Lagacé-Wiens PRS, Rendina A, Pang P, et al. CHROMagar Orientation Medium Reduces Urine Culture Workload. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2013 Apr;51(4):1179–83. Available from:

- <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02877-12>
36. Darkoh C, Chappell C, Gonzales C, Okhuysen P. A Rapid and Specific Method for the Detection of Indole in Complex Biological Samples. Schloss PD, editor. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2015 Dec;81(23):8093–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02787-15>
 37. Al-Joda BMS, Jasim AH. Biochemical Testing Revision For Identification Several Kinds of Bacteria. *J Univ Babylon* [Internet]. 2021;29(2):168–76. Available from: www.journalofbabylon.com
 38. Talaiekhosani A, Alaei S, Ponraj M. Guidelines for Quick Application of Biochemical Tests to Identify Unknown Bacteria. *SSRN Electron J* [Internet]. 2013;2(2):65–82. Available from: <https://www.ssrn.com/abstract=4101035>
 39. Webber DM, Wallace MA, Burnham C-AD. Stop Waiting for Tomorrow: Disk Diffusion Performed on Early Growth Is an Accurate Method for Antimicrobial Susceptibility Testing with Reduced Turnaround Time. McElvania E, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2022 May 18;60(5). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.03007-20>