



Ana Marília Bidarra Monteiro Dionísio

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela
Dra. Maria Paula Lourenço e pela Professora Doutora Olga Cardoso e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Marília Bidarra Monteiro Dionísio

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado
pela Dra. Maria Paula Lourenço e pela Professora Doutora Olga Cardoso e
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“A qualidade é função de todos, devendo ser encarada como uma
filosofia de trabalho, uma atitude permanente”*

Genichi Taguchi

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	7
Resumo	9
Abstract	9
Introdução	11
Caracterização do Serviço de Patologia Clínica	12
Equipamentos do Laboratório	13
Controlo de Qualidade	15
Exames laboratoriais - Aplicação clínica	16
Perfil Bioquímico	16
Marcadores de necrose do miocárdio e de insuficiência cardíaca	28
Outros parâmetros bioquímicos	34
Gasimetria	38
Doseamento de Fármacos e Drogas de Abuso	40
Doseamento hormonal sérico	48
Testes rápidos em amostras de urina	53
Amostras para análise microbiológica	58
Atividades desempenhadas no Laboratório de Serologia	59
Diagnóstico serológico de infeções por:	60
1. <i>Treponema pallidum</i>	60
2. <i>Herpes simplex</i> - tipo 1 e 2	62
3. <i>Herpes zoster</i>	62
4. Vírus Epstein-Barr (EBV)	63
5. Grupo ToRC: <i>Toxoplasma gondii</i> , Rubéola e Citomegalovírus	63
6. <i>Borrelia burgdorferi</i>	66
7. <i>Brucella spp</i>	67
8. <i>Chlamydia trachomatis</i>	68
9. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	68
10. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	69
11. <i>Rickettsia conorii</i>	69
12. <i>Coxiella burnetii</i>	70
13. <i>Legionella spp</i>	70
Amostras enviadas para o Exterior	71
Caracterização do Laboratório de Saúde Pública	72
Acreditação pelo IPAC	72

A Norma ISO 17025	74
Microbiologia das águas.....	75
Análise Microbiológica das Águas.....	76
Águas analisadas no LSP.....	77
1. Águas de consumo.....	77
2. Águas termais.....	79
3. Águas minerais naturais e de nascente	79
4. Águas de piscinas	80
5. Águas de Processo.....	82
6. Águas Balneares.....	83
Legislação em Vigor em Portugal.....	84
Água para Consumo	84
Piscinas.....	86
Águas Balneares	86
Águas Naturais Doces.....	87
Águas Minerais Naturais e de Nascente	88
Águas Termais.....	88
Controlo de Qualidade Interno (CQI).....	90
Controlo da Esterilidade	90
Controlo de Qualidade Externo (CQE)	92
Evolução do Número de amostras analisadas no LSP.....	92
Referências Bibliográficas.....	95

Lista de Abreviaturas

ALT – Alanina Aminotransferase

ANP – Peptídeo Natriurético Auricular

AST – Aspartato Aminotransferase

ATP – Adenosina Trifosfato

BNP – Peptídeo Natriurético tipo B

BUN – Blood Urea Nitrogen

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CK – Creatina Cinase

CNPG3 – cloro-nitrofenil-maltotriósido

CQI – Controlo de Qualidade Interno

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CMV – Citomegalovirus

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DGS – Direção Geral da Saúde

DPD – 3,5-diclorofenil-diazónio-tetrafluorborato

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EQUASE – Extension of Quality Assurance in Water Microbiology to Cohesion Countries

ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos

FEPTU – Food and Environment Proficiency Testing Unit

GGT – Gama-glutamil Transferase

IAF – International Accreditation Forum

ILAC – International Laboratory Accreditation Cooperation

IFI – Imunofluorescência Indireta

INSA – Instituto Nacional de Saúde

IPAC – Instituto Português da Acreditação

ISO – International Organization for Standardization

IRC – Insuficiência Renal Crónica

ISE – Ion Selective Electrodes

LDH – Lactato Desidrogenase

LSP – Laboratório de Saúde Pública da Guarda

NEQAS – United Kingdom National External Assessment Service

NYHA – New York Heart Association

PCQA – Programa de Controlo de Qualidade da Água
PCR – Proteína C Reativa
PCT – Procalcitonina
PHE – Public Health England
PTGO – Prova de Tolerância à Glicose Oral
PTH – Hormona da Paratiróide
RELACRE – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
RPR – Rapid Plasma Reagin
RIQAS – Randox International Quality Assessments
ToRCH – Toxoplasmosse, Rubéola, Citomegalovirus e Herpes
TPHA – *Treponema pallidum* Haemmagglutination Assay
TRACE – Time-Resolved Amplified Cryptate Emission
TSA – Técnico de Saúde Ambiental
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Resumo

Este relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas pela mestranda no estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra no ano letivo 2012/2013. Serão abordadas todas as áreas onde decorreu a formação, sendo descritas as principais atividades desenvolvidas, as metodologias e equipamentos usados, assim como o controlo de qualidade interno e externo.

São ainda brevemente descritas neste relatório as atividades desenvolvidas pela mestranda no setor de microbiologia das águas do Laboratório de Saúde Pública da Unidade Local de Saúde da Guarda (LSPG), onde exerce funções desde Abril de 2015.

Abstract

The objective of this report is to describe the activities developed by the master's student in the curricular stage of the Masters in Clinical Analyzes of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, held in the Laboratory of Clinical Pathology of the Hospital and University Center of Coimbra in the academic year 2012/2013. All the areas where the training took place will be discussed, describing the main activities developed, the methodologies and equipment used, as well as internal and external quality control.

The activities developed by the master's degree student in the water microbiology sector of the Public Health Laboratory of the Local Health Unit of Guarda (LSPG), where she has been working since April 2015, are also briefly described in this report.

Introdução

Atualmente as análises clínicas assumem um papel de grande importância nas ciências da saúde, revelando-se uma ferramenta fundamental para o correto diagnóstico da maioria das patologias, merecendo a confiança tanto do médico como do doente. O rigor e a qualidade aliados à especificidade dos resultados fazem com que sejam uma ferramenta fundamental no apoio ao diagnóstico e estabelecimento da decisão terapêutica bem como à monitorização da doença e definição do seu prognóstico. A interpretação dos exames laboratoriais é uma atividade de grande responsabilidade, muito mais complexa que a simples comparação com valores de referência, muito exigente do ponto de vista da ética, no cumprimento dos seus deveres, levando à necessidade de uma atualização permanente de conhecimentos técnicos e de gestão de qualidade.

As análises clínicas, que até há algum tempo serviam somente para confirmação de um diagnóstico, tornaram-se os principais meios para encontrar hipóteses de diagnóstico, contribuindo para a adequada decisão terapêutica, para o estabelecimento do prognóstico, monitorização e prevenção da doença¹.

Caracterização do Serviço de Patologia Clínica

O estágio foi realizado nos Laboratórios de Bioquímica Clínica de Urgência e de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), sob a direção do patologista clínico Dr. Fernando Rodrigues. A orientação de estágio esteve a cargo da Dra. Lucília Araújo, patologista clínica responsável pelo laboratório de urgência.

O serviço de qualidade é garantido por uma equipa multidisciplinar constituída por médicos especialistas e internos da formação específica de patologia clínica, técnicos superiores de saúde das áreas de farmácia, bioquímica, biologia e de análises clínicas e saúde pública, assistentes operacionais e assistentes técnicos.

A atividade deste laboratório é desenvolvida no “Core Lab” durante os 7 dias da semana, 24 horas por dia e, os profissionais de serviço são responsáveis pela receção, processamento, armazenamento e validação de todas as amostras recebidas. É ainda realizada a receção de todo o tipo de amostras para outros setores do laboratório. Este sector é responsável pela resposta rápida aos serviços de urgências, unidades de cuidados intensivos, e a todas as solicitações urgentes provenientes dos diferentes serviços clínicos dos CHUC.

Recursos Informáticos

O serviço de Patologia Clínica está equipado com um sistema informático de gestão laboratorial (Clinidata/Maxdata) desde 2007 que permite integrar em suporte informático os diferentes laboratórios e todos os resultados analíticos gerados, possibilitando um acesso rápido e simples aos resultados das análises de um dado utente no momento, bem como ao seu historial clínico e analítico. Este sistema de gestão traduz-se numa maior eficiência, com a conseqüente otimização dos diversos processos laboratoriais, redução de erros e conseqüente redução dos custos.

O sistema de requisição *on-line* de parâmetros analíticos (Clinidata® NET) permite que os médicos dos diferentes polos hospitalares solicitem as análises por via eletrónica. Este sistema permite reduzir os erros pré-analíticos inerentes à identificação do doente e dos tubos de colheita necessários para os parâmetros pedidos e permite que o processo de integração da amostra no sistema informático seja mais rápido e menos suscetível a erros.

Em paralelo existe um sistema informático de gestão de laboratório (Clinidata XXI) que permite visualizar o percurso das amostras dentro do laboratório, todos os resultados associados a cada amostra bem como a informação clínica e o histórico de cada doente, permitindo ainda detetar pedidos em duplicado, reduzir os erros associados à escrita manual

dos resultados, tornando o processo de registo e transmissão de resultados mais rápido. Permite a inserção de informações relativas à amostra e ao método de análise usado, visualizar os resultados relativos ao desempenho de cada equipamento (controlo de qualidade) e efetuar o processamento e análise de dados de acordo com as necessidades técnicas e científicas. O sistema possibilita ainda a visualização do custo de cada exame solicitado pelo médico requisitante bem como a visualização de alarmes relativos ao pedido ou à necessidade de informação adicional.

Existe também integrado no Clinidata XXI um módulo de gestão de *stocks*: Clinidata STK.

Adicionalmente ao Clinidata XXI, alguns setores utilizam middlewares que em última instância comunicam a sua informação para o LIS que permite o acesso à informação de todos os setores para que seja possível a máxima integração dos resultados dos utentes com a maior rapidez, com mais-valias para a avaliação, interpretação e validação de resultados. O LIS veio ainda diminuir a probabilidade de erros na transcrição de pedidos analíticos e de resultados ao facilitar a integração das amostras mediante leitura do código de barras e ao transferir automaticamente os resultados analíticos dos equipamentos para a plataforma de validação.

Equipamentos do Laboratório

Todas as análises efetuadas neste laboratório têm, em regra, um tempo de resposta de apenas algumas horas, idealmente uma hora, sendo este um ponto de importância fulcral, em contexto de urgência. Existe uma equipa altamente qualificada de técnicos superiores e de patologistas clínicos de serviço 24 horas para garantir que os resultados analíticos e a sua validação sejam o mais céleres possível.

Os equipamentos analíticos responsáveis pelo maior número de análises existem em duplicado e, em alguns casos até em triplicado, para que seja possível assegurar a continuidade do serviço nos períodos em que decorrem as manutenções diárias, o abastecimento de reagentes e mesmo em caso de avaria.

StreamLab – Siemens: Equipamento de gestão pré-analítica com *software* que permite a ligação aos analisadores Dimension. Possui módulos IOM (input/output module), centrífuga e descapsulador.



Figura 1: StreamLab (Siemens)

Dimension® RxIMax – Siemens: Equipamentos automáticos que realizam ensaios imunoenzimáticos baseados no método de “sandwich”, para doseamento sérico de marcadores de necrose do miocárdio, fármacos, álcool e amônia. Estes equipamentos estão ligados à cadeia StreamLab o que permite a pipetagem direta dos tubos primários para os ensaios realizados nestes equipamentos, libertando imediatamente o tubo para ser colocado noutro equipamento.

RAPIDLab 1260 e 1265 – Siemens: Gasómetros com metodologia de potenciometria direta e amperometria. São equipamentos automáticos que permitem a determinação de pH e gases, eletrólitos e lactatos em sangue arterial. Utilizam o método de eléctrodo seletivo de iões em comparação com o eléctrodo de referência.

- **ADVIA Centaur CP – Siemens:** Equipamento utilizado no diagnóstico *in vitro* para a determinação do peptídeo natriurético tipo B (BNP) em amostras de plasma e para o doseamento sérico das hormonas da endocrinologia reprodutiva. Auto-analisador que realiza ensaios imunoenzimáticos baseado no método de “sandwich” com quantificação por quimioluminescência.

Architect Systems I6000 – Abbott: Autoanalísadores usados para determinação dos parâmetros de bioquímica clínica e doseamento de alguns fármacos.



Figura 2: Architect Systems I6000 (Abbott)

- **Kryptor – B.R.A.H.M.S.:** o fundamento deste equipamento baseia-se na tecnologia TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission), que mede o sinal emitido a partir de um imunocomplexo em atraso. Utilizado no doseamento de procalcitonina no soro por fluoroimunoensaio.

Controlo de Qualidade

O laboratório deve demonstrar através de um programa bem definido, a qualidade dos seus resultados de forma a assegurar a rigorosa exigência com a qualidade técnica dos serviços prestados. O controlo de qualidade interno é composto geralmente por três níveis para garantir que todas as gamas de trabalho são corretamente avaliadas, uma vez que muitas vezes as patologias são diagnosticadas e avaliadas com base no aumento ou diminuição de parâmetros específicos, é necessário garantir que os equipamentos conseguem detetar e dosear corretamente níveis anormalmente baixos ou altos de cada um deles.

Os controlos são efetuados várias vezes ao dia, de acordo com o esquema estipulado para cada equipamento com base no volume de trabalho e hora do dia, para identificar quaisquer erros ou tendências que possam existir, utilizando controlos das respetivas casas comerciais, de modo a garantir que equipamentos e reagentes estão em condições ótimas para a rotina laboratorial. As cartas controlo são verificadas e avaliadas a cada série e, caso algum parâmetro não esteja dentro dos seus intervalos de confiança o equipamento é parado imediatamente para avaliar a causa do desvio e implementar as medidas corretivas adequadas (calibração, mudança de reagente, etc.).

Para além do controlo interno, o laboratório participa regularmente em programas de avaliação externa da qualidade, nomeadamente:

Randox International Quality Assessments (RIQAS):

- Therapeutic Drugs: efetuado quinzenalmente para avaliar o doseamento de fármacos.
- Liquid Cardiac: efetuado mensalmente para avaliar o doseamento sérico de marcadores de necrose do miocárdio.

United Kingdom National External Assessment Service (NEQAS):

- Quimical Chemistry: Efetuado quinzenalmente para avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos de rotina.

Digital PT:

- Blood Gases and Electrolytes: Efetuado três vezes por ano para avaliar o doseamento pH, lactatos, eletrólitos e gases em sangue arterial.

Exames laboratoriais – Aplicação clínica

Perfil Bioquímico

A Bioquímica Clínica é uma área multidisciplinar que tem como objetivo a determinação de parâmetros bioquímicos e a sua utilização no diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção da doença. Engloba duas vertentes: a analítica e a interpretativa. Os parâmetros doseados permitem o estudo das vias metabólicas, da etiologia e patogénese da doença.

Colheita e Transporte das Amostras Biológicas

A grande maioria dos parâmetros bioquímicos são determinados em amostras de soro, obtido através da colheita de sangue periférico para tubos de 4,9mL com gel ativador de coagulação. De forma a evitar a hemólise, o sangue não deve ser forçado a entrar no tubo, evitando agitação e ficando em repouso para coagular antes de ser transportado ao laboratório.

No entanto, existem algumas análises que são realizadas em plasma obtido através da colheita de sangue periférico para tubos com anticoagulantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou a heparina-lítio e outras em urina e/ou em LCR.



Figura 3: Tubos usados para colheitas de sangue periférico (Vacuette)

O laboratório recebe todo o tipo de amostras do serviço de urgência e dos internamentos das enfermarias do CHUC chegando através de auxiliares de ação médica ou através do sistema de transporte pneumático.



Figura 4: Sistema de transporte pneumático

Em circunstâncias normais, todos os tubos/contentores que chegam á recepção de amostras já estão etiquetados com a identificação do utente (nome e número de processo), com o número de amostra e com um código de barras que é lido e integrado pelo sistema informático do laboratório.

Fluxo das Amostras no Laboratório de Urgência

Após a triagem inicial, em que é verificado se a amostra foi corretamente colhida e identificada, os tubos são integrados no sistema informático através da leitura do código de barras. São depois colocados na cadeia pré-analítica que centrifuga e descapsula todos os tubos. A cadeia está ligada aos dois Dimension®RxIMax e a pipetagem das amostras para os parâmetros que executam (marcadores de necrose do miocárdio e doseamento de fármacos) é feita automaticamente nesta fase, libertando o tubo para outro equipamento. Por fim, a StreamLab separa os tubos por diversos suportes de acordo com o equipamento onde serão determinados os restantes parâmetros solicitados pelo médico. Esta sequência de trabalho elimina a necessidade de alíquotas, aumentando a celeridade do processo e minimizando o erro.

As amostras de urina, caso venham em contentor, são transferidas para tubo, centrifugadas em centrífuga exterior á StreamLab sendo os parâmetros analisados nos auto-analisadores Architect. As gasimetrias são analisadas de imediato nos gasómetros, após integração no sistema informático. As amostras de Líquido Cefalorraquidiano (LCR), após integração, são encaminhadas para o laboratório de microbiologia e aliqüotadas. Duas destas alíquotas são devolvidas ao “Core Lab” sendo uma utilizada para efetuar os doseamentos bioquímicos e a outra encaminhada para o estudo citológico por microscopia ótica.

A grande maioria dos doseamentos séricos e urinários é processada pelos dois Architect Systems I6000 e estão divididas em 3 perfis.

Perfil I

Pretende avaliar o estado geral do utente, incluindo a função renal. Os rins desempenham um papel muito importante na regulação do equilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-base, bem como na neutralização e eliminação de compostos tóxicos para o organismo através da formação de urina e da regulação da sua densidade e concentração. Para além destas funções, os rins são ainda o local de síntese de várias hormonas, entre as quais a eritropoietina (EPO), importante para a formação dos eritrócitos.

Glicose

Os níveis de glicose no sangue são regulados pelo pâncreas endócrino através da produção de insulina. Os valores séricos variam ao longo do dia de acordo com a ingestão de alimentos e a atividade física, por exemplo. Estados hiperglicemiantes ocorrem por deficiência ou falha no mecanismo de ação da insulina enquanto a hipoglicemia se associa a

patologias onde se incluem defeitos genéticos enzimáticos, síndrome de Reye, insulinomas, septicemia, Insuficiência Renal Crônica (IRC) e disfunção hepática, entre outros.

A determinação da glicose sérica constitui o procedimento laboratorial mais indicado para a avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono, diagnóstico e monitorização de diabetes *mellitus* e gestacional.

A diabetes gestacional define-se como uma intolerância aos hidratos de carbono, de grau variável, que é diagnosticada ou reconhecida pela primeira vez durante a gravidez e geralmente desaparece após o nascimento do bebé. Durante a gravidez, as hormonas produzidas pela placenta provocam aumentos da glicémia, levando o pâncreas a segregar mais insulina para manter a glicose materna em níveis normais. Quando esse aumento de insulina é insuficiente, o nível de glicose sobe, podendo dar origem à diabetes gestacional. O diagnóstico da diabetes gestacional envolve duas fases distintas: a determinação da glicémia em jejum na primeira consulta de vigilância pré-natal e prova de tolerância à glicose oral (PTGO) entre as 24 e as 28 semanas de gestação.

Situações de hipoglicémia podem ser secundárias a insuficiência renal e/ou pancreática, cirurgia gástrica, metástases hepáticas ou à terapêutica excessiva com insulina. Amostras com lipémia elevada podem causar interferência nos resultados.

A determinação da glicose sérica é realizada por espectrofotometria (metodologia enzimática – hexoquinase): a glicose é fosforilada pela hexoquinase na presença de ATP (adenosina trifosfato) e magnésio, a glicose-6-fosfato com libertação de ADP (adenosina difosfato). A glicose-6-fosfato é oxidada pela sua desidrogenase com subsequente redução de NAD a NADH. O NADH produzido é medido por espectrofotometria a 340nm. A absorvância de NADH é diretamente proporcional á quantidade de glicose².

Azoto Ureico

É o produto do catabolismo proteico endógeno e exógeno. A urémia é determinada pela perfusão renal, taxa de síntese da ureia e taxa de filtração glomerular e portanto o seu doseamento assume importância no diagnóstico diferencial da função renal, associado à determinação da creatinínemia. Outras situações em que se apresenta em concentrações séricas elevadas são: dieta rica em proteínas e atividade muscular intensa. A restrição da ingestão de proteínas, a gravidez, a desidratação, doenças hepáticas graves ou diminuição da síntese geram valores séricos diminuídos.

É determinado no soro por espectrofotometria (método cinético – urease) e a hemólise e a bilirrubinémia acentuadas interferem nos resultados. Também pode ser doseado na urina².

Creatinina

O doseamento da creatinina sérica é um método fiável para a pesquisa de lesões glomerulares e/ou tubulares. O aumento destes valores sugere que o rim tem mais dificuldade na filtração do sangue. A capacidade de filtração dos rins pode ser avaliada através das provas de depuração da creatinina.

A creatinina é o produto metabólico da creatina e fosfocreatina, de distribuição muscular quase exclusiva. A creatinina é eliminada exclusivamente pelo rim por filtração glomerular, não sendo nem secretada nem reabsorvida pelo túbulo. A produção diária de creatinina é proporcional á massa muscular do indivíduo e mantem-se relativamente constante, exceto nos casos de lesão por esmagamento ou doenças degenerativas que produzam dano muscular extenso. A determinação da creatinina sérica é o melhor critério de avaliação da taxa de filtração glomerular, útil no diagnóstico e tratamento de patologia renal.

O doseamento laboratorial é feito por espectrofotometria e o resultado pode ser falseado em casos de lipémias elevadas ou de doentes com gamapatias monoclonais de Imunoglobulina M (IgM)².

Ionograma

O cloro é o principal anião do espaço extracelular, é fundamental na manutenção do equilíbrio eletrolítico e ácido-base. A maioria do cloro ingerido é absorvido e o excesso é excretado pela urina. Níveis baixos de cloro são observados em casos de vômitos prolongados acompanhados pela perda de ácido clorídrico e em casos críticos de Doença de Addison. Níveis elevados de cloro são observados na acidose metabólica associada a diarreia prolongada com perda de bicarbonato de sódio.

O sódio é o principal catião do espaço extracelular. Aproximadamente 90% da osmolalidade do líquido extra celular é determinada pela concentração de sódio, assumindo um papel fundamental na regulação do volume de líquido no organismo. A manutenção do equilíbrio eletrolítico resulta da equação entre a perda do ião ou o ganho de água (e vice versa). A diminuição dos valores séricos de sódio pode ser devida ao uso excessivo de diuréticos, a vômitos prolongados, diminuição da ingestão de sódio na dieta; o seu aumento pode estar relacionado com a ingestão excessiva de sal sem o fornecimento adequado de água, à desidratação severa e pode ser verificado no Síndrome de Cushing.

O potássio é o principal catião do espaço intracelular. No compartimento extracelular a sua concentração é mantida dentro de limites estreitos. A manutenção do equilíbrio eletrolítico resulta da equação entre os dois compartimentos, sendo que é fundamental na

manutenção do potencial de membrana. A diminuição da ingestão de potássio na dieta, uma redistribuição do potássio extracelular ou o aumento da perda de fluidos ricos em potássio podem ser as causas da diminuição dos níveis que se caracterizam por fadiga muscular, irritabilidade, paralisia, taquicardia e eventual enfarte agudo do miocárdio. Níveis anormalmente elevados conduzem a confusão mental, fadiga geral, bradicardia e eventual colapso do sistema vascular periférico. Causas do aumento dos níveis de potássio podem estar ligadas a terapia venosa inapropriada, desidratação, choque, cetoacidose diabética ou a queimaduras graves. Em amostras com hemólise não deve ser doseado para este parâmetro, pelo seu grau de interferência.

A determinação laboratorial do ionograma sérico é feita por potenciometria indireta (ISE – elétrico potenciométrico que consiste numa membrana seletivamente permeável a um único tipo de espécie iônica)².

Cálcio

Cerca de 99% do cálcio encontra-se na forma de cristais, como fosfato tricálcico extracelular na massa óssea. Embora o cálcio plasmático represente apenas uma fração mínima, desempenha um papel muito importante na fisiologia porque é um cofator enzimático essencial para a transmissão do impulso nervoso, na preservação da normal contractilidade muscular e na cascata da coagulação. A sua determinação sérica por espectrofotometria assume importância no diagnóstico e tratamento de patologias da paratiróide, doenças ósseas, doença renal crônica, urolitíase e tetania. O hiperparatiróidismo, a hipervitaminose D, o mieloma múltiplo e algumas neoplasias ósseas são causa de hipercalcemia. A hipocalcemia pode resultar de hipoparatiroidismo, hipoalbuminemia, insuficiência renal ou de pancreatites.

O cálcio total plasmático resulta das frações ligadas a proteínas e da fração livre (ionizada). Os valores doseados dependem da concentração de albumina sérica. Assim, em situações de hipoalbuminemia é possível estimar a concentração sérica de cálcio utilizando fórmulas de cálculo assentes em valores “normais” médios de albumina, que na verdade corrigem o valor do cálcio, através de um valor estimado, como se a albumina tivesse valores normais.

A fórmula utilizada pelo laboratório é genérica e não foi, portanto, desenvolvida com base na nossa população hospitalar. De acordo com esta fórmula deve-se aumentar o cálcio total em 0,8 mg por cada g de albumina que falta para atingir o nível médio de albumina de 4,0 g/dl:

$$\text{Cálcio corrigido (mg/dL)} = (4,0 - \text{Albumina (g/dL)}) \times 0,8 + \text{Ca total (mg/dL)}$$

Os resultados obtidos são indicativos e não substituem o doseamento do cálcio ionizado. Constitui condição de cálculo e saída da análise a existência de um resultado de albumina sérica <3.1 g/dL e de cálcio total <8.8 mg/dL².

Osmolalidade

Representa a concentração de solutos osmoticamente ativos por quilograma de água, ou seja, traduz o equilíbrio de todos os solutos entre os compartimentos fisiológicos. A concentração de soluto no plasma e no soro determina a osmolalidade e interfere com o movimento de fluídos através das membranas celulares. No Homem saudável, a osmolalidade é mantida dentro de limites fisiológicos muito estreitos (entre 280 a 295mosm/Kg de água plasmática) pelo equilíbrio da ingestão e excreção de água, controlada pela vasopressina. As moléculas que mais contribuem para a osmolalidade do compartimento extracelular são o sódio, a ureia e a glicose, razão pela qual os valores séricos de osmolalidade são passíveis de cálculo².

Fórmula de cálculo no soro:

$$\text{Osmolalidade} = 1.86 (\text{Sódio}) + (\text{glicose}/18) + (\text{azoto ureico}/2,8 + 9)$$

Proteínas Totais

São todas as proteínas circulantes, nomeadamente globulinas e albumina. O seu doseamento é útil no diagnóstico e tratamento de patologias renais, hepáticas, alterações metabólicas e nutricionais. Situações de disproteinemia devem ser complementadas com a análise adicional da eletroforese das proteínas séricas².

Albumina

A albumina é produzida no fígado e é responsável pelo transporte e armazenamento de vários ligandos, pela manutenção da pressão oncótica, sendo a fonte endógena de aminoácidos para síntese de proteínas. A sua principal função é a manutenção da pressão osmótica coloidal.

A hipoalbuminemia pode resultar da diminuição da sua síntese (doença hepática), aumento do catabolismo (inflamação, lesão tecidual), aumento de perda (síndrome nefrótica ou queimaduras), diminuição da absorção (má absorção, má nutrição). A hiperalbuminemia pode ocorrer em estados de grave desidratação.

Laboratorialmente é doseada por espectrofotometria (púrpura de bromocresol)².

Perfil 2

Avalia parâmetros relacionados com a função hepática. O fígado é dos órgãos do corpo humano que mais sangue recebe, nomeadamente sangue venoso que vem dos intestinos. Este facto, associado à enorme quantidade de enzimas que catalisam uma grande variedade de reações cruciais à manutenção da vida, bem como a sua estrutura única, tornam o fígado um órgão fundamental para a regulação dos processos metabólicos do organismo. Os hepatócitos são responsáveis pelo metabolismo dos lípidos e glúcidos, pela síntese da grande maioria das proteínas do organismo e também pela desintoxicação do organismo através da neutralização e conjugação de vários compostos potencialmente tóxicos, como os fármacos, por exemplo.

A função hepática pode ser avaliada através da determinação sérica das bilirrubinas (total, direta e indireta), transaminases, gamaglutamil transferase, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, proteínas totais, albumina e tempo de protrombina.

A alteração significativa de um ou mais parâmetros hepáticos pode significar perda de função e/ou doença do fígado (hepatopatia)².

Bilirrubina total e direta

Cerca de 80 a 85% da bilirrubina tem origem no metabolismo da hemoglobina eritrocitária e a restante produção resulta do metabolismo do grupo heme de outras proteínas como a mioglobina, os citocromos e as catalases, no sistema reticuloendotelial. A bilirrubina recém-formada circula no sangue ligada á albumina sérica e é transportada para o fígado onde é captada por células parenquimatosas hepáticas para conjugação glucorónica. É posteriormente excretada pelas vias biliares no intestino.

A bilirrubina total é a soma das frações conjugada e não conjugada. O seu doseamento permite avaliar a origem da hiperbilirrubinémia: pré-hepática (anemias hemolíticas, icterícia neonatal, doença hemolítica do recém nascido), hepática (hepatite, cirrose, carcinoma hepatocelular), pós-hepática (colestase extra-hepática) e da hiperbilirrubinémia congénita crónica.

Quando a bilirrubina não é excretada, regressa ao fígado e acumula-se no sangue, havendo um aumento da sua concentração sérica. Este fenómeno leva a que a pele adquira uma tonalidade amarelada, condição patológica chamada de icterícia. A avaliação do estado e progresso da icterícia é feita pelo doseamento da bilirrubina, e a distinção entre as frações conjugada e não conjugada da bilirrubina é uma ajuda para o diagnóstico diferencial dos vários tipos de icterícia. A icterícia pode dividir-se em três tipos:

Icterícia pré-hepática – causada pelo aumento da degradação da hemoglobina, aumentando a quantidade de bilirrubina para ser conjugada.

Normalmente o fígado não é afetado e consegue conjugar e excretar na bÍlis o excesso de bilirrubina. O aumento da bilirrubina total é acompanhado pela subida do urobilinogénio no sangue e na urina. Este tipo de icterícia, pela sua origem, também se designa icterícia hemolítica.

Icterícia hepática – causada por lesão dos hepatócitos, que perdem a capacidade de desempenhar eficazmente as funções de conjugação da bilirrubina. Esta acumula-se no sangue e há um aumento da quantidade de bilirrubina excretada pelos rins, aparecendo assim na urina. Dado que a quantidade de bilirrubina direta excretada nos intestinos diminui, o mesmo acontece ao urobilinogénio.

Icterícia pós-hepática – causada por uma obstrução biliar (colestase), que faz com que a bilirrubina conjugada regresse ao fígado e se acumule no sangue, de onde é removida pelos rins e eliminada na urina. Dado que pouca ou nenhuma bilirrubina chega aos intestinos, a quantidade de urobilinogénio formado é baixa ou nula, e as fezes serão descoradas.

As amostras para doseamento de bilirrubina devem ser transportadas ao laboratório ao abrigo da luz. A hemólise interfere nos resultados (mesmo a ligeira hemólise provoca interferência negativa nos resultados) e a lipémia elevada também pode provocar interferência. A determinação é feita pelo método 3,5-diclorofenil-diazónio-tetrafluorborato (DPD), por espectrofotometria. O doseamento da bilirrubina direta, ou conjugada, é útil na avaliação da origem da icterícia: hepática (hepatite, cirrose, carcinoma hepatocelular) e pós-hepática (colestase extra-hepática)².

Transaminases

As transaminases são enzimas que se encontram dentro dos hepatócitos. Para a avaliação da função hepática são monitorizadas a aspartato aminotransferase ou transaminase glutamo-oxaloacética (AST/GOT) e a alanina aminotransferase ou transaminase glutamo-pirúvica (ALT/GPT). As transaminases catalisam a transferência reversível de um grupo amina (NH₃) do aspartato/alanina para o α -cetoglutarato, formando-se glutamato e o cetoácido correspondente ao aminoácido inicial: oxaloacetato (AST) ou piruvato (ALT). A vitamina B12 é um cofator requerido por ambas as enzimas. A AST, além de se encontrar no fígado (principalmente no citoplasma e mitocôndrias), também se encontra em vários outros

tecidos do organismo, incluindo o músculo-esquelético, músculo cardíaco, tecido adiposo e no cérebro, entre outros, enquanto que a ALT encontra-se predominantemente no fígado (embora apenas no citoplasma) e é mais específica para a função hepática².

Alanina Aminotransferase (ALT)

Enzima intracelular citoplasmática do metabolismo dos aminoácidos que catalisa a transformação reversível de ácidos α -ceto em aminoácidos por transferência de grupos amina. A atividade hepática é significativamente superior (10 vezes) à verificada noutros órgãos, como o coração e o sistema músculo-esquelético.

Valores elevados no soro indicam doença do parênquima hepático, com deterioração da integridade da membrana plasmática do hepatócito. É mais sensível que a AST no diagnóstico de doença hepatobiliar. Níveis acentuadamente elevados ocorrem em situações associadas a necrose hepatocelular aguda de origem vírica, tóxica ou circulatória, como nas hepatites (vírica ou tóxica), cirrose, mononucleose e colestase extra-hepática. Laboratorialmente é determinado por espectrofotometria².

Gama-glutamil Transferase (GGT)

Enzima que regula o transporte de aminoácidos através das membranas celulares, catalisando a transferência de um grupo glutamyl do glutatião para receptores peptídicos.

O aumento da concentração sérica corresponde, essencialmente, a origem hepatobiliar, incluindo colestase, cirrose e doença infecciosa hepática, sendo um indicador sensível, mas não específico, da presença de doença hepatobiliar. A atividade desta enzima microsomal aumenta com a ingestão elevada de álcool em virtude da indução da síntese enzimática em resposta a esta molécula. A metodologia laboratorial usada para o doseamento é a espectrofotometria².

Fosfatase Alcalina

Encontra-se em quase todos os tecidos, nas membranas celulares, com níveis mais elevados no epitélio intersticial, túbulos renais, osteoblastos, fígado e placenta. A sua função metabólica não é completamente conhecida, mas encontra-se associada ao transporte de lípidos a nível intestinal e à calcificação dos ossos. Apresenta aumentos fisiológicos em crianças na fase de crescimento (intensa atividade osteoblástica e remodelação óssea), a partir do 2º trimestre de gravidez devido à produção placentária e na menopausa devido à osteoporose.

A causa patológica mais frequente de níveis elevados desta enzima é a doença hepatobiliar. Doenças primárias do tecido ósseo, como por exemplo a osteomalácia, osteogênese imperfeita ou tumores ósseos primários, assim como patologias secundárias, tais como metástases esqueléticas, mieloma múltiplo, insuficiência renal, hipertireoidismo e acromegália também podem condicionar níveis elevados de fosfatase alcalina. Níveis reduzidos são detetados na hipofosfatase familiar, hipoparatiroidismo, acondroplasia, doença óssea adinâmica nos doentes em diálise, nanismo pituitário e má nutrição. Laboratorialmente é doseada por espectrofotometria e os resultados são muito influenciados pela existência de hemólise².

Perfil 3

Engloba os parâmetros bioquímicos marcadores de Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) em cerca de 90 a 95% dos casos, de acordo com a literatura. O EAM provoca o aumento da concentração plasmática de várias substâncias libertadas na circulação pela lesão das células miocárdicas: troponinas T e I, Creatina Cinase (CK), Lactato Desidrogenase (LDH) e mioglobina. Diagnostica-se o EAM quando os níveis sanguíneos dos biomarcadores com alta sensibilidade e especificidade estão elevados em doentes com sintomas de isquemia do miocárdio.

Aspartato Aminotransferase (AST)

Enzima presente em vários tecidos, como o fígado, o músculo cardíaco, músculo-esquelético, cérebro, rins, pulmões, pâncreas, eritrócitos e leucócitos. Atividades mais elevadas ocorrem a nível hepático e muscular.

O seu doseamento é feito em amostras de soro, por espectrofotometria e é útil para o diagnóstico e monitorização de doença hepatobiliar, sobretudo nas doenças em que ocorre destruição de hepatócitos. Pode ser útil também no diagnóstico e monitorização de enfarte do miocárdio e lesão músculo-esquelética. Podem ser encontrados níveis aumentados em situações de cirrose, colestase extra-hepática, pancreatite aguda e doença hemolítica².

Creatina Cinase (CK)

Enzima que catalisa a fosforilação reversível da creatina por adenosina trifosfato (ATP). É um dímero composto pela combinação de subunidades M (Muscle) e B (Brain), podendo existir as isoformas CK-MM, CK-BB e CK-MB. A fração MM é a mais relevante quando se doseiam valores plasmáticos.

É o indicador mais sensível de lesões musculares, com significativa relevância no diagnóstico e monitorização do enfarte do miocárdio. Aumenta sempre em situações que envolvam necrose ou regeneração muscular.

Doseado por espectrofotometria, sendo que as amostras hemolisadas não devem ser processadas².

Lactato Desidrogenase (LDH)

Enzima que catalisa a oxidação reversível do lactato em piruvato, essencial para a produção de energia muscular. O seu doseamento é útil na avaliação de situações que envolvam lesão tecidual, em diagnósticos diferenciais de anemia hemolítica e como marcador tumoral em algumas neoplasias, tais como os tumores das células germinativas. Os níveis séricos aumentam em casos de hepatite, nefrite glomerular, embolia pulmonar e em algumas leucemias e linfomas. Como se trata de um marcador não específico, é usado em combinação com outros marcadores no diagnóstico e no tratamento. A determinação laboratorial é feita por espectrofotometria e mesmo uma ligeira hemólise interfere nos resultados².

Marcadores de necrose do miocárdio e de insuficiência cardíaca

CK-MB massa

A creatina cinase (CK) catalisa a fosforilação reversível da creatina por ATP. É um dímero composto por subunidades de músculo (M) e/ou cérebro (B) que se associam para formar as isoenzimas CK-MM, CK-MB e CK-BB. A CK-MB está presente essencialmente no músculo cardíaco, aumentando significativamente após danos no miocárdio. Em certa medida, o aumento proporcional na fração CK-MB depende da dimensão dos danos cardíacos. As alterações da proporção de CK-MB para CK total podem ser utilizadas no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio (EAM) com melhorada sensibilidade e especificidade através da relação de aumento de CK-MB/CK³.

Os níveis sanguíneos da CK-MB aumentam nas primeiras 6 horas de evolução do EAM, alcançando o seu valor máximo cerca das 14-24 horas, diminuindo depois para os valores normais ao fim de 48 horas. Considera-se que, quanto mais elevados forem os valores da CK-MB, maior será o tamanho do EAM. Pode haver aumento dos valores circulantes da CK-MB em várias situações não cardíacas como por exemplo: lesões do músculo-esquelético por traumatismo, queimaduras, injeções intramusculares, entre outras. Contudo, nestas situações, o valor da CK-MB não costuma ultrapassar os 5% do valor total da CK, em virtude da concentração da CK-MB no músculo-esquelético não ser superior a 5%, ao passo que, no miocárdio, é de cerca de 15%⁴.

A CK-MB constitui o marcador bioquímico de eleição para o peri operatório de enfarte do miocárdio durante as primeiras 48 horas após o início da dor. As concentrações de CK-MB têm sido utilizadas também para avaliar a extensão do EAM e de recidivas subsequentes. No entanto, é menos específica que a troponina^{5,6}.

A sua determinação laboratorial é feita por ensaio imunoensaio enzimático de um passo, baseado no princípio da “sanduíche”. A amostra é incubada com partículas de dióxido de crómio revestidas com anticorpos monoclonais específicos para a subunidade CK-MB, e reagente conjugado (anticorpos monoclonais específicos para a isoenzima CK-MB marcados com β -galactosidase). Forma-se uma “sanduíche” partícula/CK-MB/conjugado durante o período de incubação. O conjugado não ligado é removido por separação magnética e lavagem. A β -galactosidase ligada à “sanduíche” é combinada com o substrato cromogénico β -d-galactopiranosido vermelho de clorofenol (CPRG). A hidrólise do CPRG liberta um cromóforo (CPR). A concentração de CK-MB presente na amostra é diretamente proporcional à taxa de alteração de cor devido à formação do CPR, medido a 577nm. Os resultados são apresentados em ng/mL ou μ g/L.

Troponina I

A troponina I existe em três formas moleculares distintas, que correspondem a isotipos específicos encontrados no músculo-esquelético de contração rápida, no músculo-esquelético de contração lenta e no músculo cardíaco, respectivamente. Os isotipos do músculo-esquelético são semelhantes em tamanho molecular, aproximadamente 20000 Dalton, mas apresentam uma heterogeneidade da sequência de aminoácidos de aproximadamente 40%. O isotipo cardíaco também exibe uma heterogeneidade de sequência de cerca de 40% em relação aos isotipos do músculo-esquelético, mas possui igualmente 31 resíduos suplementares na terminação amina, resultando num peso molecular de cerca de 24000 Dalton^{7,8}.

Vários relatórios existentes na literatura indicam que a troponina I cardíaca é libertada para o sangue algumas horas após o início dos sintomas de enfarte do miocárdio e que permanece elevada durante vários dias após um enfarte. Os dados cumulativos obtidos a partir destes relatórios indicam que os níveis de troponina I se tornam anormais 4 a 8 horas após o início da dor precordial, atingem o pico entre as 12 e as 16 horas e mantêm-se elevados durante 5 a 9 dias após a ocorrência de um enfarte.^{7,8,9} Com base nestes estudos, aparentemente a troponina I mantém-se elevada durante um período de tempo que abrange a janela de diagnóstico da CK-MB e LDH¹⁰.

Estudos clínicos sugerem igualmente uma especificidade cardíaca melhorada da troponina I, quando comparada com a CK-MB, para a detecção de lesões do miocárdio na presença de lesões do músculo-esquelético^{11,12}.

A concentração de troponina I cardíaca proporciona uma determinação sensível e específica das lesões do miocárdio numa larga janela de diagnóstico. As elevações nos níveis de troponina I cardíaca foram observadas ao longo de um espectro de síndromas coronárias agudas, incluindo eletrocardiograma com ou sem desnivelamento do segmento ST e angina instável.

As troponinas cardíacas são biomarcadores de necrose miocárdica e não apenas de enfarte do miocárdio^{13,14}. As elevações de troponinas cardíacas em condições médicas que não enfartes foram já bem descritas e refletem diferentes níveis de necrose miocárdica, fora de um contexto isquémico¹⁵. Não devem ser entendidas como “falsos positivos” e devem ser tidas em conta devido ao elevado valor prognóstico relativamente à morbidade e mortalidade¹⁶.

As condições que podem provocar a elevação dos valores de troponina incluem traumatismos torácicos, cirurgia cardíaca e não cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, toxicidade cardíaca provocada por fármacos, doenças inflamatórias como

miocardite, embolismo pulmonar, doenças infiltrativas, e doenças neurológicas agudas. Embora o tratamento deva basear-se na causa subjacente primária, reconhece-se que qualquer elevação de troponina é premonitória de resultados adversos^{17,18}.

O método de doseamento da troponina I cardíaca (CTNI) é um imunoenensaio colorimétrico, altamente sensível. A troponina é o complexo da proteína reguladora contráctil do músculo estriado. Encontra-se periodicamente ao longo do filamento fino das miofibrilhas, em conjunto com a proteína tropomiosina. O complexo da troponina é constituído por três componentes polipeptídicos distintos: troponina C (o elemento de ligação ao cálcio), troponina I (o elemento inibidor da actinmiosina ATPase) e a troponina T (o elemento de ligação à tropomiosina). O complexo serve para regular a interação dependente do cálcio entre a miosina e a actina, desempenhando assim um papel integral na contração muscular.

A amostra é incubada com partículas de dióxido de crómio revestidas com anticorpos monoclonais específicos para a troponina I cardíaca, e um reagente conjugado (fosfatase alcalina - ALP) marcado com um anticorpo monoclonal específico para a troponina I cardíaca, para formar uma “sanduíche” partícula/troponina I cardíaca/conjugado. O conjugado não ligado é removido por separação magnética e lavagem. O equipamento calcula e transmite automaticamente a concentração de troponina I em ng/mL ao sistema informático. Os resultados deste teste devem sempre ser interpretados em conjunto com o histórico médico do doente, estado clínico e outros dados de interesse.

O ensaio é suscetível ao efeito provocado por doses de antigénios muito elevadas (efeito de “prozona”), em que um excesso de antigénio impede a ligação simultânea de anticorpos de captura e deteção a uma única molécula de substância a analisar. Este tipo de amostras devem ser diluídas e o ensaio deve ser repetido.

Mioglobina

A mioglobina é uma heme-proteína de ligação de oxigénio do músculo estriado (cardíaco e esquelético). Ao contrário da hemoglobina, não tem capacidade para libertar O₂ exceto numa situação de pO₂ extremamente reduzida. O aumento da concentração sérica de mioglobina ocorre após lesão do músculo cardíaco ou esquelético, em situações de ferimentos provocados por esmagamento, convulsões, miopatias inflamatórias, injeções intramusculares, exercício físico intenso, queimaduras e enfarte do miocárdio.

Numa situação de enfarte do miocárdio a mioglobina é um dos primeiros marcadores a aumentar, cerca de 1 a 3 horas após o episódio, mesmo antes do aumento dos outros marcadores cardíacos bioquímicos (Troponina I e CK-MB)^{19,20}. O pico da mioglobina ocorre

6 a 12 horas após o episódio e normaliza passadas 24 a 36 horas. Apesar de não apresentar especificidade cardíaca assume-se de extrema importância na exclusão do diagnóstico. Solicitada juntamente com a troponina revela-se útil no diagnóstico precoce do enfarte agudo do miocárdio.

Vários estudos demonstram a importância da monitorização da mioglobina como um auxiliar de diagnóstico, para estratificação de risco do enfarte do miocárdio com valores preditivos negativos que podem atingir os 100%, após o início dos sintomas^{21,22}.

O método Dimension[®] MYO é um imunoensaio enzimático de dois passos, baseado no princípio da “sanduíche”. A amostra é incubada com partículas de dióxido de cromo revestidas com anticorpos monoclonais específicos para a mioglobina, para formar um complexo partícula/mioglobina. As partículas são separadas magneticamente e o sobrenadante é removido. Durante o segundo passo, o complexo partícula/MYO é incubado com reagente conjugado (anticorpos monoclonais específicos para a mioglobina marcados com β -galactosidase) para formar uma “sanduíche” partícula/mioglobina/conjugado. O conjugado não ligado é removido por separação magnética e lavagem. A β -galactosidase ligada à “sanduíche” é combinada com o substrato cromogénico β -d-galactopiranosídeo vermelho de clorofenol e catalisa a hidrólise do substrato em vermelho de clorofenol (CPR). A concentração de mioglobina presente na amostra do doente é diretamente proporcional à taxa de alteração de cor devido à formação do CPR, medido a 577nm.

Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP)

O sistema do péptido natriurético é uma família de péptidos estruturalmente semelhantes, mas geneticamente distintos, que inclui o péptido natriurético auricular (ANP) e o péptido natriurético tipo B (BNP) de origem nas células do miocárdio e o péptido natriurético tipo C (CNP) de origem nas células endoteliais. Estes péptidos caracterizam-se por uma estrutura anelar de 17 aminoácidos comuns com uma ligação de dissulfureto entre dois resíduos de cisteína. Os péptidos natriuréticos cardíacos são os antagonistas naturais do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso simpático. Promovem a natriurese e a diurese, agem como vasodilatadores e exercem efeitos antimitogénicos nos tecidos cardiovasculares²³.

O ANP e o BNP são segregados pelo coração em resposta ao stress hemodinâmico. Os níveis acrescidos de BNP são basicamente produzidos em resposta à distensão da parede ventricular esquerda e à sobrecarga de volume. O ANP e o BNP são predominantemente expressos nas aurículas e ventrículos, respetivamente, e são importantes na regulação dos eletrólitos, da tensão arterial e da homeostasia²³⁻²⁷.

O sistema de péptidos natriuréticos cardíacos é ativado no seu grau mais elevado com a disfunção ventricular e tem um papel importante na manutenção do estado compensado da insuficiência cardíaca assintomática e no atraso da progressão da doença. O BNP é sintetizado dentro do cardiomiócito como pré-pro-hormona (pre-pro-BNP) de 134 aminoácidos, dos quais derivam uma pré hormona (proBNP) de 108 aminoácidos e um péptido sinal de 26 aminoácidos. A proteína precursora proBNP é então dividida num péptido C-terminal de 32 aminoácidos fisiologicamente ativo (BNP 77-108; BNP) e num fragmento de pro-hormona N-terminal de 76 aminoácidos (NT-pro-BNP 1-76). Os estudos indicam que a proteína precursora pro-BNP é dividida no interior ou à superfície dos cardiomiócitos e que tanto o NT-pro-BNP (1-76) como a molécula de BNP C-terminal fisiologicamente ativa (77-108) são libertados no fluxo sanguíneo^{28,29,30}.

O ensaio ADVIA Centaur BNP mede apenas a molécula de BNP fisiologicamente ativa (77-108) e utiliza anticorpos monoclonais específicos da sua parte C-terminal e estrutura anelar.

Os valores elevados de BNP que ocorrem na insuficiência cardíaca são produzidos como resposta à distensão da parede ventricular esquerda e à sobrecarga de volume, sendo indicadores de mau prognóstico.

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica importante que compromete a função sistólica ou diastólica ventricular esquerda ou a combinação de ambas. A insuficiência cardíaca ocorre quando o coração é incapaz de bombear sangue a uma velocidade suficiente para as necessidades metabólicas. As suas causas mais comuns são a doença das artérias coronárias, hipertensão, doenças cardíacas valvulares cardiomiopatias. Um diagnóstico exato e precoce são importantes dado que existem intervenções terapêuticas eficazes (p. ex., inibidores da enzima de conversão da angiotensina, (β -bloqueadores) que melhoram tanto a morbidade como a mortalidade. Com base nos sinais e sintomas clínicos, a gravidade da insuficiência cardíaca é classificada em função de quatro classes de crescente progressão da doença, de acordo com a classificação da New York Heart Association (NYHA classes I – IV).

Vários estudos indicam que o BNP pode ser utilizado num amplo espectro de aplicações clínicas, incluindo diagnóstico, monitorização e prognóstico. Os níveis de BNP em circulação aumentam com a redução da função ventricular esquerda e com o aumento da gravidade clínica da insuficiência cardíaca, de acordo com a classificação da NYHA, o que o torna um teste apropriado para o diagnóstico e classificação da insuficiência cardíaca^{28,29,31-33}.

Outros estudos demonstraram que um nível acrescido de BNP em circulação está correlacionado com uma maior incidência de eventos cardíacos e mortalidade em doentes com insuficiência cardíaca e síndromes coronárias agudas, e apoiam a utilização do BNP como marcador para o prognóstico do doente³⁴⁻³⁹.

O seu doseamento é feito em amostras de plasma obtido por centrifugação de sangue total colhido com EDTA, por quimioluminescência e é útil para diagnóstico, avaliação, prognóstico e monitorização terapêutica da insuficiência cardíaca. Acentuada hemólise das amostras interfere nos resultados.

O ensaio ADVIA Centaur BNP é um imunoensaio totalmente automatizado do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminescente direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos monoclonais. O primeiro anticorpo, no Reagente Lite, é um fragmento F(ab') de BNP anti-humano monoclonal de rato marcado com éster de acridina² específico da estrutura anelar do BNP. O segundo anticorpo, na Fase Sólida, é um anticorpo anti-humano monoclonal específico da parte C-terminal do BNP, ligado a partículas magnéticas.

Níveis elevados de BNP na apresentação inicial estão associados a um risco acrescido de mortalidade em doentes com enfarte do miocárdio.

Outros parâmetros bioquímicos

Proteína C reativa (PCR)

Proteína de fase aguda de elevada sensibilidade, usada para avaliação e tratamento de varias situações de infeção, inflamação, lesão tecidual, proliferação neoplásica e processos necróticos. Estados inflamatórios ligeiros revelam aumentos da PCR entre 1,0 – 5,0 mg/dL, inflação ativa e infeções bacterianas entre 5,0 – 20,0 mg/dL e inflamações severas e trauma valores superiores a 20,0 mg/dL.

Evidências recentes demonstram que aumentos da PCR dentro dos valores de referência podem ser associados a futuros eventos coronários em indivíduos aparentemente saudáveis, utilizando para o efeito métodos de elevada sensibilidade.

Neste contexto, a PCR de elevada sensibilidade poderá assegurar o propósito de prever e avaliar o risco de episódios cardiovasculares em indivíduos aparentemente saudáveis, com doença coronária estável ou síndromes coronários agudos.

A determinação sérica é por metodologia de imunoturbidimetria ultrasensível, pelo que amostras com lipémia elevada pode dar origem a resultados falseados².

α -Amilase

A amilase pancreática é sintetizada pelas células acinares e é uma das enzimas mais estáveis do organismo, e catalisa o metabolismo dos hidratos de carbono provenientes da dieta, nomeadamente o amido e o glicogénio. É excretada por filtração glomerular e depois 50% é reabsorvida a nível tubular.

Aumentos plasmáticos ocorrem na pancreatite aguda, parotidite, alcoolismo e insuficiência renal ou ainda em consequência de um traumatismo no abdómen superior ou após procedimentos como a CPRE. O doseamento da alfa-amilase na urina está indicado na investigação da hiperamilasémia associada com macroamilasémia ou insuficiência renal. A hipoamilasémia pode ser observada na fibrose quística avançada, doença hepática grave e após pancreatectomia.

A metodologia de doseamento laboratorial é feita pelo método CNPG3 (cloro-nitrofenil-maltotriósido), por espectrofotometria².

Bicarbonato

A determinação laboratorial do bicarbonato permite obter informação sobre o equilíbrio eletrolítico do utente. A amostra de soro deve ser processada imediatamente para minimizar a sua exposição ao ar, o que pode falsear os resultados.

Esta determinação é feita por método enzimático, por espectrofotometria e é útil no diagnóstico e tratamento de alterações do equilíbrio ácido-base. Valores elevados ocorrem na acidose respiratória compensada e na alcalose metabólica. Valores baixos ocorrem na alcalose respiratória compensada e na acidose metabólica².

Fósforo inorgânico

A maioria do fósforo no organismo (80 a 85%) está presente nos ossos como hidroxiapatite, o restante está na forma de fósforo inorgânico e ésteres de fosfatos. O cálcio e o fósforo apresentam uma relação de reciprocidade habitualmente. O aumento de fósforo sérico pode ocorrer na hipervitaminose D, no hipoparatoróidismo, rabdomiólise, em casos de destruição celular hepática e na insuficiência renal. Níveis séricos baixos são observados na deficiência de vitamina D, síndromes de má absorção e em situações que provoquem aumento da atividade da hormona da paratiroide (PTH)².

Magnésio

Cofator enzimático, fundamental na glicólise, respiração celular e no transporte transmembranar de cálcio. A eliminação renal é condicionada pela atividade da PTH. A deficiência de magnésio conduz a uma diminuição das funções neuromusculares manifestadas por hiperirritabilidade, tetania, convulsões e alterações eletrocardiográficas. Pode ocorrer nas situações de alcoolismo crónico, diabetes, hipertiroidismo, hipoparatiroidismo, hipocaliémia, síndromes de má absorção e pancreatite aguda. A hipermagnesémia pode ocorrer em situações de insuficiência renal, desidratação, acidose diabética e doença de Addison. A hemólise interfere nos resultados².

Colinesterases

Enzimas que catalisam a hidrólise de acetilcolina em colina e ácido acético. Esta reação é fundamental para a recuperação da sinapse nervosa. Existem dois grupos de colinesterases: acetilcolinesterases (colinesterase eritrócitária) e pseudocolinesterases (colinesterase plasmática). Distinguem-se essencialmente pela hidrólise mais ou menos rápida do substrato, acetilcolina ou butirilcolina. O doseamento é feito por espectrofotometria e está indicado para avaliação de estados de deficiência em pseudocolinesterase, avaliações pré-operatórias

e nas intoxicações por compostos organofosforados em que os valores baixos decorrem de dano hepático acentuado. Valores aumentados podem ocorrer na diabetes *mellitus*, doença coronária, síndrome de Gilbert e hiperlipoproteinemia tipo IV².

Amoníaco

O amoníaco é o produto do metabolismo dos aminoácidos e é doseado laboratorialmente por espectrofotometria (método enzimático) em amostras de plasma, colhido para tubo com heparina-lítio. A amostra deve ser centrifugada e doseada imediatamente (20 minutos). Uma amostra deixada à temperatura ambiente durante 6 horas duplica o valor plasmático de amônia. A hemólise e a lipémia interferem nos resultados².

O doseamento é útil no diagnóstico e monitorização da encefalopatia hepática e do coma hepático nas fases terminais da cirrose hepática, da insuficiência hepática, da necrose aguda e subaguda e da síndrome de Reye. A hiper-amonémia em lactentes pode ser um indicador de anomalias hereditárias do ciclo da ureia².

Ácido Úrico

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, a sua síntese é essencialmente hepática e a eliminação renal. Pode ser determinado por espectrofotometria em amostras de soro e de urina das 24 horas, sendo que o seu doseamento está indicado principalmente em situações de hiperuricémia primária que resulta do déficit enzimático no metabolismo das purinas. A hiperuricémia secundária pode estar associada a insuficiência renal, doenças mieloproliferativas, doenças hemolíticas, psoríase, policitemia vera, intoxicação por chumbo, jejum e em doentes em tratamento com quimioterapia. A hipouricémia ocorre em situações de deficiência da enzima purina nucleósido fosforilase, situações de elevada excreção urinária (doenças malignas, síndrome de Fanconi, Diabetes *Mellitus* e no síndrome hipereosinofílico) e nos tratamentos com agentes uricosúricos².

Densidade

Corresponde à proporção de massa de uma solução comparada com a massa de igual volume de água. É determinada na urina e em outros líquidos biológicos e é útil para avaliação e monitorização dos distúrbios hidro-electrolíticos, caracterização de exsudatos e transudatos. A análise é efetuada por refratometria².

Procalcitonina (PCT)

É um péptido precursor da calcitonina que em indivíduos saudáveis é detetado no sangue em níveis muito baixos ou mesmo indetetável. Em situações de infecção de órgãos e tecidos (rim, tecido adiposo, pulmão, fígado) a segregação para a corrente sanguínea aumenta consideravelmente. É considerado um marcador mais eficaz na diferenciação entre estados infecciosos e não infecciosos, quando comparado com a PCR ou a contagem leucocitária, permitindo antecipar o tratamento. Pode ainda assumir valor prognóstico⁴⁰.

A procalcitonina (PCT), a pró-hormona da calcitonina, é uma proteína de fase aguda constituída por 116 aminoácidos. Normalmente é produzida nas células C da tiroide, mas em resposta a endotoxinas bacterianas ou citocinas pró-inflamatórias passa a ser produzida por diversos tipos de células e órgãos, como os rins, pulmões, tecido adiposo e fígado. A PCT é considerada atualmente um marcador diagnóstico de infecção bacteriana grave e sépsis. O seu valor normal situa-se abaixo dos 0,05 ng/mL e a sépsis condiciona níveis elevados desse marcador no plasma. Enquanto valores entre os 2 e 10 ng/mL tornam o diagnóstico de sépsis muito provável, valores iguais ou superiores a 10 ng/mL tornam-no quase certo. A PCT é preferencialmente induzida por infeções graves e generalizadas de origem bacteriana, parasitária ou fúngica, com manifestações sistémicas, enquanto infeções virais ou SIRS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica) de origem não infecciosa não induzem elevações significativas da PCT. Vários estudos concluem que proteína C reativa (PCR) é também um marcador útil para diagnóstico de SIRS e sépsis. Reconhecem-se vantagens da PCT em relação à PCR: após estímulo apropriado, a secreção da PCT inicia-se dentro de 4 horas, atingindo o seu pico às 8 horas, enquanto o pico da PCR é atingido apenas às 36 horas. A semivida da PCT é de 20 a 24 horas, pelo que a normalização dos seus valores será rápida com a resolução do quadro. Além disso, a PCT apresenta especificidade relativa para SIRS induzida por infeções bacterianas. Em doentes críticos pode ser difícil distinguir sépsis de outras situações que cursem com resposta inflamatória aguda, como ocorre após intervenções cirúrgicas extensas, trauma abdominal, ou falência multiorgânica.⁴⁰ Um aumento moderado nas concentrações de PCT é expectável em alguns doentes, após certos tipos de cirurgias, como por exemplo, em cirurgias abdominais extensas ou retroperitoneais, na ausência de infeção⁴⁰.

Gasimetria

O estudo dos gases no sangue arterial é seguramente o teste da função respiratória mais frequentemente efetuado nos dias de hoje. Em pneumologia é um elemento fundamental na avaliação da função respiratória nas diversas patologias que a alteram, mas também nas situações de urgência e nos cuidados intensivos é hoje uma rotina.

Os fatores que levaram à sua grande utilização resultam de que, em termos fisiopatológicos, a análise dos gases do sangue arterial permite obter uma informação global e em tempo real dos diversos processos envolvidos na respiração, assim como do equilíbrio ácido-base⁴¹.

A facilidade de obtenção de amostras, independentemente da gravidade do doente, sem necessidade nem dependência da sua colaboração e a possibilidade de obter resultados rapidamente com os modernos analisadores automáticos são também fatores que têm levado à sua generalização.

Geralmente, esta amostra é colhida da artéria radial no pulso, por um médico. A colheita de sangue deve ser feita para uma seringa com heparina/lítio como anticoagulante. Homogeneizar invertendo suavemente e enviar de imediato ao laboratório para determinar o valor da concentração de oxigénio e de dióxido de carbono no sangue, bem como o pH, cálcio ionizado e lactatos⁴¹.

pH – A manutenção do valor de pH é essencial para a homeostasia do organismo. O valor de pH é considerado dentro de valores normais quando se encontra dentro do intervalo 7,35 e 7,45. O metabolismo celular necessita que a concentração dos iões de hidrogénio esteja dentro de limites bem definidos. Os pulmões e os rins são os órgãos responsáveis pela regulação deste equilíbrio.

PaCO₂ – Exprime a eficácia da ventilação alveolar, dada a grande difusibilidade deste gás. Se existe uma maior ventilação alveolar, elimina-se mais CO₂ e a PaCO₂ diminui. Descreve a componente respiratória do equilíbrio ácido base. O valor da PaCO₂ é considerado normal entre 35 e 45mmHg.

HCO₃⁻ – O ião de bicarbonato é o principal elemento do sistema tampão do organismo. As alterações na concentração de bicarbonato encontradas no sangue arterial podem desencadear desequilíbrios ácido-base por distúrbios metabólicos. O valor de HCO₃ é considerado normal entre 22 e 28 mEq/L.

PaO₂ – Expressa a eficácia das trocas de oxigénio entre os alvéolos e os capilares pulmonares. É um indicativo da capacidade dos pulmões em fornecer oxigénio ao sangue. O valor da PaO₂ deve ser superior a 80 mmHg, diminuindo em função da idade.

SaO₂ – Corresponde à percentagem de hemoglobina no sangue arterial que se encontra ligada ao oxigénio e é considerado um valor normal quando superior a 95%.

Tabela I: Resumo das alterações diagnosticadas e monitorizadas com Gasimetria.

Acidose respiratória compensada	• pH normal , PaCO ₂ aumentada e HCO ₃ ⁻ normal
Alcalose respiratória compensada	• pH normal, PaCO ₂ diminuída e HCO ₃ ⁻ normal
Acidose respiratória descompensada/ Acidémia respiratória	• pH diminuído, PaCO ₂ aumentada e HCO ₃ ⁻ normal
Alcalose respiratória descompensada/ Alcalémia respiratória	• pH aumentado, PaCO ₂ diminuída e HCO ₃ ⁻ normal
Acidose metabólica compensada	• pH normal, HCO ₃ ⁻ diminuído e PaCO ₂ normal
Alcalose metabólica compensada	• pH normal, HCO ₃ ⁻ aumentado e PaCO ₂ normal
Acidose metabólica descompensada/ Acidémia metabólica	• pH diminuído, HCO ₃ ⁻ diminuído e PaCO ₂ normal
Alcalose metabólica descompensada/ Alcalémia metabólica	• pH aumentado, HCO ₃ ⁻ aumentado e PaCO ₂ normal

A acidose láctica pode ocorrer com uma reduzida perfusão tecidual ou sem indícios claros de hipóxia dos tecidos. As doenças associadas a uma reduzida oxigenação dos tecidos incluem a insuficiência cardíaca congestiva e as anemias graves.

As doenças associadas ao segundo tipo incluem a diabetes *mellitus*, a insuficiência renal e as doenças hepáticas, nas quais a produção do ácido láctico pode estar elevada ou a sua eliminação inadequada. O lactato assume-se como um indicador de hipoperfusão tecidual localizada ou difusa.

Doseamento de Fármacos e Drogas de Abuso

O doseamento de fármacos pode ser feito em amostras de soro ou de plasma colhido com os anticoagulantes heparina, citrato ou EDTA por imunotubidimetria no Dimension® RxIMax, exceto nos casos em que é referido outro método ou equipamento.

Antibióticos Aminoglicosídeos

Após a descoberta da estreptomicina em 1944 por Waksman, a partir do actinomicete *Streptomyces griseus*, os aminoglicosídeos tornaram-se uma importante classe de antibióticos, contribuindo para um grande avanço na medicina, nomeadamente no tratamento da tuberculose. Várias características desta classe têm contribuído para este sucesso como, por exemplo o facto de serem antibióticos de largo espectro, apresentarem efeito pós-antibiótico, ação bactericida dependente da concentração e baixo custo. Em 1949 surgiu a neomicina isolada a partir de *Streptomyces fradiae* seguindo-se, em 1957, a canamicina isolada a partir de *Streptomyces kanamyceticus*. A gentamicina foi isolada a partir do actinomicete *Micronospora purpurea* em 1963 e a tobramicina foi produzida a partir do *Streptomyces tenebrarius* em 1967. A amicacina nasce em 1972 como derivado semissintético da canamicina e, quatro anos depois, foi introduzida a netilmicina, derivado semissintético da sisomicina. A descoberta destes compostos deu origem à criação de um novo grupo de antibióticos, bastante homogéneo, o dos aminoglicosídeos. Depois de ser conhecida a relação entre a estrutura química e a ação farmacológica por um lado e os mecanismos de resistência por outro, novos aminoglicosídeos passaram a ser obtidos por processos semissintéticos⁴².

Tabela 2: Antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas.

Inibição da síntese proteica nos ribossomas		
30s	Aminoglicosídeos (Estreptomicina, Gentamicina, Canamicina e Amicacina)	Bactérias Gram negativas aeróbias (<i>Klebsiella sp.</i> , <i>Serratia sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>) e <i>Staphylococcus aureus</i>
	Tetraciclina (Doxiciclina)	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Brucella sp.</i> , <i>Rickettsiaceae</i> , <i>Chlamydia sp.</i> e <i>Mycoplasma sp.</i>

São antibióticos usados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas aeróbias. Exemplos desta classe de antibióticos são a gentamicina, tobramicina e amicacina usados no tratamento inicial de sépsis graves como infecções nosocomiais em combinação com os β -lactâmicos e a estreptomomicina e a canamicina indicados no tratamento da tuberculose e brucelose.

De forma geral, os aminoglicosídeos apresentam uma rápida ação bactericida, dependendo da dose administrada: quanto maior a dose mais rapidamente exercem o efeito bactericida e maior a duração de ação. Para além disso, é também característico deste grupo farmacológico o efeito pós-antibiótico que exerce, ou seja, a atividade antibacteriana residual persiste mesmo após atingirem concentrações plasmáticas inferiores às concentrações inibitórias mínimas dos microrganismos. Estas propriedades farmacodinâmicas sugerem uma maior eficácia em toma única diária, apesar de a sua semivida plasmática ser bastante curta e por isso a administração menos frequente de doses mais elevadas poderá maximizar o efeito bactericida do fármaco. O espectro de ação destes fármacos é, de modo geral, bastante alargado, abrangendo não só bactérias gram-negativas e gram-positivas como ainda o bacilo de Koch. Assim, e apesar da introdução nas últimas décadas de antibióticos potentes e menos tóxicos, os aminoglicosídeos têm desempenhado um papel importante no tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos, enterococos e estreptococos. É frequente o uso combinado com beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos) de forma a obter-se um efeito sinérgico no tratamento de infecções graves por bacilos gram-negativos⁴².

Estes antibióticos penetram no interior das bactérias Gram negativas, por difusão facilitada nas purinas presentes na membrana externa. O local de ação é a subunidade 30s dos ribossomas, que é composto por vinte e uma proteínas e uma molécula 16s de ARN. O antibiótico aminoglicosídeo liga-se à proteína 12s na subunidade 30s ribossômica, o que leva a um erro de leitura do código genético. A síntese proteica pode ser inibida de duas formas diferentes, por interferência sobre o complexo de iniciação ou a leitura errónea do ARNm, que leva à incorporação de diferentes aminoácidos, resultando numa proteína não funcional.

Gentamicina

É um antibiótico aminoglicosídeo de largo espectro utilizado no tratamento de infecções bacterianas graves causadas por bactérias aeróbias Gram-negativas.

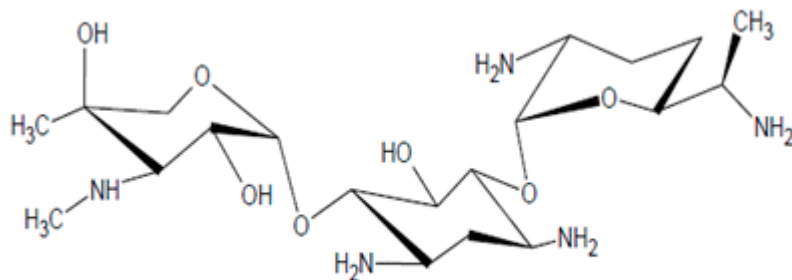


Figura 5: Estrutura química da gentamicina.

Distribui-se sobretudo no líquido extracelular (altamente hidrofílico). A farmacocinética apresenta uma grande variabilidade inter e intra-individual, sendo fundamental para a otimização da terapêutica proceder à monitorização sérica e ajuste farmacocinético. É recomendada a avaliação semanal de creatinina e BUN (Blood Urea Nitrogen), para avaliação da eficácia e/ou toxicidade do regime posológico utilizado.

A colheita deve ser feita de preferência, após o estado de equilíbrio, ao fim da terceira toma. Em multidose deve ser colhida a amostra em vale (30 minutos antes da administração) e em pico (1 hora após o término da infusão de 30 minutos ou da injeção intramuscular). Pode ocorrer reatividade cruzada com outros aminoglicosídeos de estrutura semelhante (como por exemplo a netilmicina)⁴².

Tobramicina

É um antibiótico de largo espectro utilizado no tratamento de infecções bacterianas graves causadas por bactérias aeróbias Gram negativas. Pode ser doseado por imunoturbidimetria em soro ou plasma com os anticoagulantes heparina, citrato e EDTA. Amostras lipémicas interferem nos resultados. Possível reatividade cruzada com outros aminoglicosídeos de estrutura química semelhante. Devem avaliar-se, pelo menos semanalmente, os valores de creatinina sérica⁴².

Amicacina

A amicacina pertence à família da canamicina, tal como as canamicinas A e B e a tobramicina; todos caracterizados por possuírem dois amino-açúcares ligados diretamente à 2-desoxiestreptamina. A amicacina é um derivado semissintético da canamicina A por acilação do grupo 1-amino da 2-desoxiestreptamina com o ácido 2-hidroxi-4-aminobutírico.

Tal como as restantes moléculas dos aminoglicosídeos, a amicacina apresenta um elevado número de radicais OH e NH que a tornam uma molécula policatiónica com características básicas de elevada polaridade que lhe conferem elevada solubilidade em água mas que a tornam praticamente insolúvel nos lípidos. Estas características não só influenciam o seu comportamento farmacocinético como comprometem a sua atividade antimicrobiana a pH ácido e em condições de anaerobiose⁴².

Em particular, o espectro de atividade da amicacina é dos mais amplos de todo o grupo. Em virtude da sua resistência a muitas das enzimas que inativam vários aminoglicosídeos, a amicacina desempenha um papel, por enquanto, essencial a nível hospitalar onde prevalecem microrganismos resistentes à gentamicina e à tobramicina. A amicacina mostra-se ativa contra a grande maioria dos bacilos gram-negativos aeróbios incluindo *Serratia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Escherichia coli* que são resistentes à gentamicina e tobramicina. É particularmente ativa sobre a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Acinetobacter baumannii*. Assim, a amicacina é atualmente utilizada no tratamento de várias infeções, destacando-se: infeções nosocomiais do trato respiratório inferior, incluindo pneumonia grave; infeções intra-abdominais, incluindo peritonite; infeções do trato urinário, complicadas ou recorrentes; infeções da pele e dos tecidos moles, incluindo infeções de queimaduras; endocardite bacteriana; septicémia bacteriana incluindo sépsis neonatal; infeções intra-abdominais pós-operatórias⁴².

O espectro da atividade da amicacina é o maior do grupo dos aminoglicosídeos. Quanto à margem terapêutica a amicacina apresenta uma concentração máxima entre 20 a 35 µg/ml e uma concentração mínima entre 1 a 8 µg/ml. A dose de amicacina deve ser ajustada individualmente a cada doente de acordo com o peso corporal ideal e a função renal.

Utilizada no tratamento de infeções bacterianas sensíveis quando outros antibióticos menos tóxicos não são efetivos. Nos seus efeitos tóxicos inclui-se a nefrotoxicidade e ototoxicidade, mais frequentes ainda nos doentes com compromisso renal. A farmacocinética apresenta uma grande variabilidade inter e intra-individual, sendo fundamental, para a otimização da terapêutica, proceder à monitorização sérica e ajuste farmacocinético. Deve avaliar-se semanalmente creatinina e BUN. A colheita deve ser feita, de preferência, após o estado de equilíbrio, ao fim da terceira toma.

Netilmicina

Está indicada no tratamento das seguintes infecções graves, provocadas por bactérias sensíveis à netilmicina: bacteriemia, septicemia (incluindo septicemia neonatal); infecções graves das vias respiratórias; infecções renais e urogenitais, se outros antibióticos menos tóxicos foram ineficazes ou contraindicados; infecções da pele e dos tecidos moles (incluindo queimaduras, feridas, infecções peri operatórias: só se os microrganismos forem sensíveis e se outros antibióticos forem contraindicados); infecções intra-abdominais (incluindo peritonite) e infecções do trato gastrointestinal.

A netilmicina está recomendada como terapêutica inicial, em associação com um antibiótico beta-lactâmico, em infecções graves, quando o microrganismo ainda não foi identificado ou, com terapêutica apropriada em caso de infecção anaeróbia.

Vancomicina

Glicopéptido tricíclico que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese da parede celular das bactérias sensíveis por meio da sua ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-alanil-D-alanina de unidades precursoras da parede celular, impedindo o alongamento do peptidoglicano e a ligação cruzada. A vancomicina é utilizada em situações de sépsis ou endocardite causadas pelos estafilococos resistentes à metilina, apesar de não ser tão efetiva como a penicilina. Assim, tende a ser usada em associação com a gentamicina, em caso de alergia à penicilina. Também é recomendada, em associação com a 7 ceftriaxone, cefotaxima ou rifampicina no tratamento da meningite pneumocócica resistentes à penicilina⁴².

Acetaminofeno (paracetamol)

O acetaminofeno é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas. A absorção gastrointestinal é rápida e completa com um pico plasmático máximo 20 a 30 minutos após a administração. A metabolização é hepática e envolve a glucoronidação em 90% da dose. As crianças têm menor capacidade de glucoronidação que os adultos. Apenas uma pequena percentagem do fármaco é excretado na forma inalterada. O tempo de semi-vida plasmática é de 2 a 3 horas. Doses excessivas ou prolongadas podem induzir toxicidade, sendo a hepatotoxicidade a situação mais comum mas podem também ocorrer: necrose tubular aguda, pancreatite e necrose miocárdica. A overdose de paracetamol pode causar danos hepáticos severos e pode resultar em insuficiência hepática e morte. A necrose

hepática pode ser esperada após a absorção de 15,8 g de acetaminofeno num adulto de 70 Kg. A dose média terapêutica é de 20 mg/Kg.

A metodologia usada para o doseamento é a espectrofotometria. A colheita deve ser feita 4 horas após a administração. Amostras moderadamente ictéricas interferem nos resultados e pode ocorrer reatividade cruzada com outros compostos p-aminofenólicos e N-acetilcisteína.

Fármacos anti-epiléticos

Ácido valpróico (2-ácido propilpentanóico) é um medicamento anticonvulsivo de largo espectro, utilizado no tratamento da epilepsia. Está comercializado na forma intravenosa e oral, e utiliza-se em monoterapia ou em associação com outros antiepiléticos, quer para o tratamento imediato da crise quer na sua profilaxia. Tem também ação sobre o humor nas psicoses maníaco-depressivas e pode ser útil na profilaxia da enxaqueca. A colheita deve ser feita, de preferência, após o estado de equilíbrio, ao fim de 3 a 4 dias, 30 minutos antes da toma.

Carbamazepina: quimicamente diferente dos outros anticonvulsivantes apresentando por isso algumas vantagens terapêuticas. É um derivado dos antidepressivos tricíclicos, usado em primeira linha na profilaxia anti-epilética a longo prazo.

A farmacocinética deste tipo de moléculas apresenta uma grande variabilidade inter e intra-individual devido a fatores como a via de administração, a forma medicamentosa e as características do doente. A monitorização das concentrações séricas dos fármacos é fundamental durante a instituição da terapêutica, para o ajuste das dosagens. São recomendadas avaliações periódicas das enzimas hepáticas, hemograma completo, amónia e sódio para determinação da eficácia e/ou toxicidade do regime posológico utilizado.

A colheita deve ser realizada, de preferência, após ser atingido o estado de equilíbrio, normalmente ao fim de 2 a 10 dias. A administração concomitante de cetirizina ou de hidoxizina podem interferir nos resultados.

Fenitoína

É um fármaco anticonvulsivante indicado no tratamento da epilepsia, de convulsões corticais focais e da epilepsia do lobo temporal. A toxicidade está frequentemente relacionada com a dosagem e afeta principalmente o sistema nervoso central. A

monitorização das concentrações séricas do fármaco é fundamental durante a instituição da terapêutica, para o ajuste das dosagens. Devem monitorizar-se periodicamente as enzimas hepáticas, a amónia, a albumina, o sódio e os parâmetros hematológicos.

Fenobarbital

Está indicado no tratamento de crises epilépticas, crises febris e convulsões. Os sintomas de toxicidade do fenobarbital incluem sedação, ataxia, excitação paradoxal, discrasia sanguínea (incluindo distúrbios da coagulação em recém-nascidos de mães que tomaram o fármaco durante a gravidez), alterações hepáticas, erupções cutâneas (incluindo formas esfoliativas graves), osteomalácia e coma. A monitorização das concentrações séricas do fármaco é fundamental durante a instituição da terapêutica para o ajuste das dosagens. É recomendada a avaliação periódica do estado mental e a determinação de hemograma completo.

Digoxina

A digoxina é um glicosídeo utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e de certos tipos de arritmias cardíacas. A intoxicação por digoxina é um problema relativamente comum e grave em termos clínicos, devido à sua estreita margem terapêutica, que pode resultar de uma combinação entre variados fatores, com muitos dos sinais de toxicidade a sobreporem-se aos da doença cardíaca. A farmacocinética apresenta uma grande variabilidade inter e intra-individual, sendo pois fundamental para a otimização da terapêutica proceder à monitorização sérica e ajuste farmacocinético. São recomendadas avaliações semanais de creatinina, potássio, magnésio e cálcio. A colheita deve ser realizada, de preferência, após ser atingido o estado de equilíbrio. Amostras acentuadamente lipídicas interferem nos resultados e pode ocorrer reatividade cruzada com outros digitálicos e com a espironolactona. A metodologia laboratorial usada para a sua determinação é imunoenzimática, por espectrofotometria.

Teofilina

A teofilina é um derivado da metilxantina, amplamente utilizada no tratamento da asma, doença pulmonar obstrutiva crónica e apneia do recém-nascido. De uma forma geral tem uma ação estimulante a nível do sistema nervoso central e mais específica a nível do centro respiratório. Com a sua estreita margem terapêutica, passa-se rapidamente de uma

ação terapêutica broncodilatadora para os seus efeitos adversos que vão de náuseas e vômitos, dores, cefaleias, insónia, a taquicardia e a arritmias ventriculares e morte. Amostras lipémicas interferem nos resultados.

Metotrexato

É um fármaco com ação antineoplásica utilizado no tratamento da leucemia⁴³, linfoma não-Hodgkin, cancro da mama e do pulmão^{44,45}, psoríase, artrite reumatoide, doença de Crohn e noutras de carácter autoimune. É doseado no soro por fluorescência de polarização.

Barbitúricos

Os barbitúricos têm ação depressiva do sistema nervoso central e são usados na clínica para ação sedativa e hipnótica. Quando utilizados como substância de abuso são administrados oralmente sob a forma de comprimidos ou dissolvidos e injetados hipodermicamente. Dependendo do grau de solubilidade nos lípidos, os barbitúricos são geralmente caracterizados por uma ação curta, intermédia ou longa. Os mais associados ao abuso são os de ação curta e intermédia. Os períodos de semi-vida variam entre as 20 e as 120 horas. Podem ser doseados no soro por método enzimático (espectrofotometria) e na urina por teste imunocromatográfico.

Benzodiazepinas

As benzodiazepinas são fármacos com atividade sedativa e hipnótica de utilização essencialmente terapêutica, mas também passíveis de abuso. A utilização crónica de benzodiazepinas pode provocar dependência física e as situações de abstinência cursam com insónia, agitação, irritabilidade, tensão muscular e nos casos mais graves, alucinações, psicose e convulsões. O abuso crónico pode resultar em intoxicação e induzir severas alterações ao nível do sistema nervoso central. A metabolização da maioria das benzodiazepinas é hepática e a eliminação é renal. O metabolito mais comum é o oxazepam constituindo o indicador de maior utilidade na avaliação dos estados de abuso. Podem ser doseados no soro por método enzimático (espectrofotometria) e na urina por teste imunocromatográfico.

Alcoolémia

O álcool é a substância tóxica mais frequentemente encontrada no âmbito médico-legal. Para além das questões legais o seu doseamento, é útil na avaliação e tratamento de estados de dependência bem como de intoxicação. O alcoolismo é uma importante causa de doença e falência hepática constituindo também uma causa de morte assinalável. A absorção é rápida, por difusão, iniciada no estômago (20%) mas é essencialmente intestinal (80%). Cerca de 1 hora após a ingestão, a distribuição no compartimento aquoso é completa podendo ser doseado no sangue mesmo antes deste período. A metabolização hepática é rápida, originado inicialmente acetaldeído e depois acetato, precursor de acetil-CoA. Cerca de 5% da dose ingerida é excretada de forma inalterada pelos pulmões e rins, essencialmente.

Não se deve usar álcool na desinfeção da pele para a punção de colheita e a amostra deve ser enviada imediatamente ao laboratório. Para o seu doseamento pode ser utilizado soro ou plasma com os anticoagulantes heparina-lítio, heparina-sódio, EDTA, fluoreto de sódio e oxalato de potássio.

Doseamento hormonal sérico

O tratamento da infertilidade é uma área da Medicina complexa e sujeita a evolução e progressos constantes. A infertilidade é definida pela OMS como a incapacidade de um casal conceber após um período de um ano de relações sexuais desprotegidas e regulares. Esta tem vindo a crescer, fruto de múltiplos fatores em que a idade, cada vez mais avançada, da primeira gravidez assume um papel preponderante. Afeta cerca de 14% da população na maior parte dos países e entre estes casais só uma pequena proporção terá uma esterilidade definitiva, o que representa 3-5% dos casais em idade reprodutiva.

Hormonas são mensageiros químicos produzidos pelo organismo, estando envolvidas no processo de produção de espermatozoides e ovócitos. Quando ocorrem problemas com o seu funcionamento, poderão surgir dificuldades em conseguir uma gravidez. Pelo menos 20% das mulheres com problemas de infertilidade sofrem de perturbações hormonais, que causam problemas na ovulação. O recurso a medicamentos indutores da ovulação é uma das soluções clínicas habitualmente utilizadas nestas situações.

A produção de ovócitos envolve a interação de diferentes hormonas. O processo inicia-se no hipotálamo com a produção da hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH). Esta vai estimular a hipófise a libertar a hormona folículo-estimulante (FSH) que vai atuar sobre os ovários, promovendo o desenvolvimento de folículos.

Os folículos produzem estrogénios, que estimulam a hipófise a libertar outra hormona: a LH, ou hormona luteinizante, que promove a rutura do folículo e a libertação do ovócito. A partir do folículo sai o corpo amarelo (corpo lúteo), que por sua vez produz outra hormona, a progesterona, que prepara o útero para que este se torne num ambiente favorável à implantação do ovócito fertilizado.

Para agilizar o processo, com uma resposta 24/24 horas durante os 7 dias da semana, os pedidos de doseamentos hormonais da consulta de fertilidade (FSH, LH, progesterona e hCG) são processados e validados no laboratório de urgência.

Hormona Foliculoestimulante (FSH)

A hormona foliculoestimulante (FSH) é uma hormona glicoproteica com duas subunidades. A subunidade alfa é semelhante às da hormona luteínizante (LH), da gonadotropina coriónica humana (hCG) e da hormona estimulante da tiroide (TSH). A subunidade beta é diferente das de outras hormonas glicoproteicas e confere a sua especificidade bioquímica⁴⁶.

A FSH é segregada pela pituitária anterior em resposta à hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) segregada pelo hipotálamo.⁴⁴ Tanto em homens como em mulheres, a secreção de FSH é regulada por um equilíbrio de mecanismos de resposta positiva e negativa que envolvem o eixo hipotalâmico-pituitário, os órgãos reprodutivos e as hormonas pituitárias e esteroides sexuais^{48,49}. A FSH e a LH têm um papel crítico na manutenção do normal funcionamento dos sistemas reprodutores masculino e feminino.

Tabela 3: Tecidos alvo e as ações da FSH em mulheres e homens

<i>Categoria</i>	<i>Tecidos alvo</i>	<i>Ações</i>
mulheres	folículos dos ovários	estimula o desenvolvimento dos folículos e a produção de estradiol e outros estrogénios durante a fase folicular do ciclo menstrual ¹ age sinergisticamente com a LH para originar a ovulação ²
homens	células de Sertoli nos túbulos seminíferos dos testículos	estimula a espermatogénese

Os níveis anormais de FSH, com os correspondentes níveis acrescidos ou reduzidos de LH, estrogénios, progesterona e testosterona, estão associados a uma série de condições patológicas.⁴⁷ Os níveis acrescidos de FSH estão associados à menopausa e à hipofunção primária dos ovários nas mulheres e ao hipogonadismo primário nos homens.

Os níveis reduzidos de FSH estão associados à hiperfunção primária dos ovários nas mulheres e ao hipergonadismo primário nos homens. Os níveis normais ou reduzidos de FSH estão associados à doença policística dos ovários nas mulheres.

O ensaio ADVIA Centaur CP FSH é um imunoenensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos que têm especificidade em relação à molécula de FSH intacta.

Hormona luteinizante (LH)

A hormona luteinizante (LH) é uma hormona glicoproteica com duas subunidades. A subunidade alfa é semelhante às da hormona foliculoestimulante (FSH), da gonadotropina coriónica humana (hCG) e da hormona estimulante da tiroide (TSH). A subunidade beta é diferente das de outras hormonas glicoproteicas e confere a sua especificidade bioquímica^{46,50}.

A LH é segregada pela pituitária anterior em resposta à hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) segregada pelo hipotálamo^{46,47}. Nos homens, a LH também se chama hormona estimulante das células intersticiais^{46,50}. Tanto em homens como em mulheres, a secreção da LH é regulada por um equilíbrio de mecanismos de resposta positiva e negativa que envolvem o eixo hipotalâmico-pituitário, os órgãos reprodutivos e as hormonas pituitárias e esteroides sexuais^{48,49}. A LH e a outra gonadotropina pituitária, a FSH, desempenham um papel crítico na manutenção do normal funcionamento dos sistemas reprodutores masculino e feminino.

Tabela 4: Tecidos alvo e as ações da LH em mulheres e homens^{46,47}

<i>Categoria</i>	<i>Tecidos alvo</i>	<i>Ações</i>
mulheres	células da teca dos folículos ováricos	• estimula a produção de andrógenos que a FSH converte em estradiol durante a fase folicular
	foliculo graafiano	• age sinergisticamente com a FSH para originar a ovulação durante o pico a meio do ciclo
	corpo lúteo	• estimula a formação do corpo lúteo após a ovulação • estimula a secreção de progesterona durante a fase lútea
homens	células de Leydig no tecido intersticial dos testículos	• estimula a secreção de testosterona

Os níveis anormais de LH, com os correspondentes níveis acrescidos ou reduzidos de FSH, estrogénios, progesterona e testosterona estão associados a uma série de condições patológicas⁴⁷. Os níveis acrescidos de LH estão associados à menopausa, à hipofunção

primária dos ovários e à doença poliquística dos ovários nas mulheres e ao hipogonadismo primário nos homens. Os níveis reduzidos de LH estão associados à hiperfunção primária dos ovários nas mulheres e ao hipergonadismo primário nos homens.

O ensaio ADVIA Centaur CP LH é um imunoenensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos que têm especificidade em relação à subunidade beta da molécula de LH intacta.

A administração de hormona libertadora de gonadotropina (GnRH), citrato de clomifene e gonadotropina humana de menopausa (hMG) em mulheres pode resultar em valores endógenos de LH elevados, enquanto a administração de estrogénios ou testosterona pode resultar em valores endógenos de LH reduzidos. A administração de hMG em homens pode resultar em valores endógenos de LH elevados, enquanto a administração de testosterona reduz os valores endógenos de LH.

Progesterona

A progesterona, em conjunto com os estrogénios, regula as funções do trato reprodutivo durante o ciclo menstrual. A progesterona é crítica na preparação do endométrio para a implantação do blastocisto e na manutenção da gravidez. As principais fontes da progesterona nas mulheres são o corpo lúteo e a placenta. Fontes menos significativas de progesterona são o córtex supra-renal no homem e mulher e os testículos nos homens.

Os níveis de progesterona são baixos durante a fase folicular do ciclo menstrual. Após a ovulação, a produção de progesterona pelo corpo lúteo aumenta rapidamente, atingindo a máxima concentração 4 a 7 dias após a ovulação. Estes níveis são mantidos durante 4 a 6 dias e depois caem para os níveis de referência, induzindo a menstruação.^{51,52} Durante a gravidez, os níveis de progesterona sobem de forma estável até aos níveis mais altos no terceiro trimestre.

A avaliação da progesterona confirma a ovulação e a função lútea normal nas mulheres não grávidas. Uma produção inadequada de progesterona pelo corpo lúteo pode indicar deficiência da fase lútea (LPD), a qual está associada à infertilidade e aos abortos precoces^{53,54}.

As mulheres que utilizam contraceptivos orais têm níveis de progesterona suprimidos⁵⁵.

O ensaio ADVIA Centaur CP Progesterona é um imunoenensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta.

Com o aparecimento de novos medicamentos à base de esteroides (análogos) de estrutura química semelhante à progesterona, existe a possibilidade de reatividade cruzada e resultados falsamente elevados. Para fins de diagnóstico, os resultados devem sempre ser avaliados em conjunto com o historial médico do doente, avaliação clínica e outros dados de interesse.

Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) é uma glicoproteína com duas subunidades não ligadas por covalência. A subunidade alfa é semelhante às da hormona luteinizante (LH), da hormona foliculoestimulante (FSH) e da hormona estimulante da tiroide (TSH)^{56,57}.

A subunidade beta da hCG difere de outras hormonas glicoproteicas pituitárias, o que resulta nas suas propriedades bioquímicas e imunológicas únicas. A hCG é sintetizada pelas células da placenta e está implicada na manutenção do corpo lúteo durante a gravidez. Deteta-se logo na primeira semana após a conceção.⁵⁶ Na gravidez, os níveis de hCG aumentam exponencialmente durante 8 a 10 semanas após o último ciclo menstrual. Mais tarde, durante a gravidez, cerca de 12 semanas após a conceção, a concentração de hCG começa a baixar à medida que a placenta começa a produzir hormonas esteroides.

Outras fontes de valores elevados de hCG são a gravidez ectópica, a ameaça de aborto e o fim recente de uma gravidez.

O ensaio ADVIA Centaur CP Total hCG (ThCG) é um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos.

Os níveis de hCG detetados durante a gravidez normal foram determinados e os intervalos de 95% estão apresentados na tabela que se segue. A produção de hCG é extremamente rápida a seguir à conceção e é variável entre indivíduos. Um valor negativo não exclui a gravidez.

Uma mulher com um valor negativo deve ser submetida a nova análise após 2 dias porque os valores da hCG na gravidez normal duplicam a cada 48 horas.

Tabela 5: Valores esperados de hCG ao longo da gestação.

Idade gestacional	n	Mediana	Valores esperados da hCG (mIU/ml) (IU/l)
2–4 semanas	34	334	39,1–8388
5–6 semanas	76	19.220	861–88.769
6–8 semanas	58	43.326	8636–218.085
8–10 semanas	65	106.397	18.700–244.467
10–12 semanas	62	82.199	23.143–181.899
13–27 semanas	51	28.800	6303–97.171
28–40 semanas	48	15.881	4360–74.883

Testes rápidos em amostras de urina

Anfetaminas

As anfetaminas são aminas simpaticomiméticas com atividade estimulante do SNC, passíveis de induzir dependência psicológica e fisiológica. A detecção na urina por imunocromatografia é possível 3 horas após administração até às 24-48 horas após a última administração.

Canabinóides

A cannabis é a droga ilegal mais usada em todo o mundo. Os compostos alucinogênicos de canabinóides incluem o delta-9-tetra-hidrocanabinol (THC), o canabidiol e o canabinol. O THC é o principal psicoativo na marijuana (preparada a partir das folhas secas e flores) e no hashish (preparado a partir da resina e potencialmente mais tóxico), ambas provenientes da planta do cânhamo, *Cannabis sativa*, originária do mar negro e Cáspio mas existente um pouco por todo o mundo. Contém pelo menos 61 canabinóides (classe de produtos químicos derivados do terpeno exclusivos da planta do cânhamo). O THC age como um sedativo hipnótico suave que pode provocar euforia, estados de grande excitação e, em doses maiores, até mesmo alucinações. É rapidamente metabolizado nos pulmões e fígado e distribuído nos tecidos corporais (elevada lipossolubilidade) pelo que não é excretado inalterado na urina. O ácido 11-nor-delta-9-THC-9-carboxílico, o seu principal metabolito, torna-se detetável por imunocromatografia na urina apenas algumas horas após a administração. Nos consumidores crónicos, o THC pode acumular-se no tecido adiposo mais rapidamente do que consegue ser excretado, permitindo tempos de detecção superiores na urina nestes consumidores do que em consumidores ocasionais, podendo a eliminação renal prolongar-se de 72 horas após administração até 1 mês em situações de abstinência. A inalação passiva do fumo de marijuana pode causar uma elevação da concentração de THC na urina até níveis de 10 a 40 ng/mL.

Cocaína

A cocaína é um alcalóide (benzoilmetilecgonina) que deriva da planta *Erythroxylon coca*, largamente cultivada na América do Sul. É normalmente consumida por inalação sob a forma de sal hidrocloreto, que pode também ser dissolvido e administrado por via endovenosa. É um estimulante do sistema nervoso central, cujo abuso pode provocar euforia, reação de alerta, ansiedade, insónia, hiperatividade, paranoia, psicose grave e até mesmo conduzir ao suicídio. É bem absorvida por via oral, nasal e gastrointestinal. A

administração oral produz um pico aos 60 minutos enquanto por via nasal o pico ocorre 30-60 minutos com efeitos quase imediatos. A cocaína é rapidamente metabolizada por hidrólise, o tempo de semi-vida biológica da é de 0:30 a 1:30 horas. O metabolito benzoilecgonina tem um tempo de semi-vida de 5 a 8 horas podendo ser detetado por imunocromatografia na urina 48 a 72 horas e até mesmo 3 semanas após nas utilizações frequentes e longas de cocaína.

Opiáceos

Os opiáceos incluem a morfina, a codeína e a heroína. A morfina e a codeína são alcaloides naturalmente existentes no opio, obtido a partir das vagens verdes da papoila do opio, *Papaver somniferum*. Ambas apresentam uma utilização clínica como analgésicos contudo, são por vezes sujeitas a abuso. A heroína é um composto sintetizado e é o opiáceo sujeito a abuso com maior frequência. Os opióides são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal mas são também absorvidos por via nasal, respiratória, subcutânea e intramuscular. Todos os opiáceos são de rápida metabolização hepática, com um tempo de duração da ação, após administração, de 3 a 6 horas.

Pesquisa de *Legionella spp*

A Doença do Legionário, assim designada após o surto de 1976 na convenção da Legião Americana em Filadélfia, é provocada pela *Legionella pneumophila* e caracteriza-se como uma doença respiratória com febre elevada que se pode manifestar de uma forma leve ou tornar-se uma pneumonia fatal.⁵⁸ A doença tanto ocorre na forma epidémica como endémica e os casos esporádicos não se distinguem facilmente de outras infeções respiratórias pelos sintomas clínicos. Estima-se a ocorrência de 25 000 a 100 000 casos de infeção por *Legionella* nos Estados Unidos da América por ano. A taxa de mortalidade resultante, que varia entre os 25% a 40%, pode ser reduzida se a doença for diagnosticada rapidamente e se for instituída precocemente uma terapia antimicrobiana adequada.⁵⁹ Os fatores de risco conhecidos incluem a imunossupressão, hábitos tabágicos, consumo de álcool e doença pulmonar concomitante.⁵⁹ Os jovens e os idosos são particularmente suscetíveis^{60,61}.

A *Legionella pneumophila* é a responsável por 80-90% dos casos de infeção por *Legionella*, sendo o serogrupo I responsável por mais de 70% de todos os casos de legionelose.^{59,60,61} Os métodos atuais de deteção laboratorial de pneumonia provocada pela *Legionella pneumophila* exigem a utilização de uma amostra colhida nas vias respiratórias (por

exemplo, saliva com expetoração, lavagem brônquica, aspiração transtraqueal, biópsia aos pulmões) ou soros emparelhados (fase aguda e de convalescença) para um diagnóstico exato. Estas técnicas incluem cultura da *Legionella*, anticorpos fluorescentes diretos, teste de ADN e anticorpos fluorescentes indiretos. Todas estas opções dependem da obtenção de uma amostra respiratória adequada com sensibilidade suficiente ou da recolha de soro com um intervalo de duas a seis semanas. Lamentavelmente, um dos sinais presentes nos pacientes com a Doença do Legionário é a relativa falta de produção de expetoração.⁶³ Em muitos pacientes, é necessária a utilização de um procedimento invasivo para a obtenção de uma amostra das vias respiratórias. O diagnóstico através de técnicas serológicas tem normalmente uma natureza retrospectiva, ainda assim, a colaboração do paciente para a obtenção da amostra necessária é fraca.

O teste BinaxNOW[®] *Legionella* Antígeno Urinário é um teste imunocromatográfico rápido para a deteção qualitativa do antígeno *Legionella pneumophila* do serogrupo I em amostras de urina de pacientes com sintomas de pneumonia. Destina-se a auxiliar no diagnóstico da doença do legionário causada por *L. pneumophila* em conjunto com o método cultural e outros métodos. O diagnóstico rápido da doença do legionário e a instituição precoce do tratamento apropriado têm diminuído consideravelmente os índices de morbidade e de mortalidade^{58,59}.

A deteção do antígeno na urina (ou no líquido pleural) é um método acessível, rápido e relativamente barato, com uma sensibilidade de cerca de 70% e especificidade quase de 100%. Tem as vantagens de ser fácil obter uma amostra adequada de urina (mais do que uma de expetoração ou secreções brônquicas) e de o teste se manter positivo durante semanas, apesar de terapêutica antibiótica eficaz. Porém, só deteta antígenos de *Legionella pneumophila* do serogrupo I. As serologias, em que a pesquisa e determinação do título de anticorpos são feitas por imunofluorescência indireta têm maior utilidade epidemiológica.

Pesquisa de *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae* é o principal microrganismo causador da pneumonia contraída na comunidade e pode ser o agente mais importante na pneumonia contraída na comunidade de etiologia desconhecida.^{64,65} A pneumonia pneumocócica apresenta uma taxa de mortalidade elevada, de 30%, dependendo da bacteriemia, idade e doenças subjacentes.^{64,66} Quando não é adequadamente diagnosticada e tratada, a infeção por *S. pneumoniae* pode levar a bacteriemia, meningite, pericardite, empiema, púrpura fulminante, endocardite e/ou artrite^{67,68}.

A meningite pneumocócica, uma condição que, frequentemente, leva a lesões cerebrais permanentes ou à morte, pode ocorrer como uma complicação de outra infecção pneumocócica ou pode ocorrer espontaneamente sem outra doença precedente.⁶⁹ Afeta pessoas de todas as idades, mas é mais comum em crianças com menos de 5 anos, adolescentes e jovens adultos e em idosos.⁷⁰ A progressão de doença pouco grave ao coma pode ocorrer em apenas algumas horas, tornando decisivos o diagnóstico e o tratamento antimicrobiano imediatos. Vinte a trinta por cento de todos os doentes de meningite pneumocócica morrerão, muitas vezes, apesar de vários dias de tratamento com um antibiótico apropriado.⁶⁹ A mortalidade é mesmo superior entre os doentes muito jovens e os doentes muito idosos⁶⁹.

O BinaxNOW[®] *Streptococcus pneumoniae* da Alere fornece um método rápido e simples para o diagnóstico da pneumonia pneumocócica utilizando uma amostra de urina convenientemente colhida, armazenada e transportada. Fornece ainda um diagnóstico imediato e altamente eficaz da meningite pneumocócica quando é analisado o líquido cefalorraquídeo.

O teste BinaxNOW[®] *S. pneumoniae* é um ensaio imunocromatográfico rápido para a deteção qualitativa do antígeno de *S. pneumoniae* na urina de pacientes com pneumonia e no líquido cefalorraquídeo de pacientes com meningite. Foi desenvolvido para auxiliar, juntamente com a cultura e outros métodos, no diagnóstico de pneumonia pneumocócica e meningite pneumocócica, fornecendo identificação rápida e precisa do antígeno de *S. pneumoniae* com uma tecnologia fácil de usar, ajudando o médico a instituir um tratamento rápido e específico contribuindo assim para a diminuição dos custos de cuidados médicos, para a melhoria do paciente e para a luta global contra a resistência a antibióticos.



Figura 6: Testes rápidos para deteção dos antígenos de *L. pneumophila* e *S. pneumoniae*.

Mononucleose Infeciosa

A mononucleose infecciosa é provocada pelo vírus Epstein-Barr e é comum em adolescentes e crianças. Os sintomas típicos incluem fadiga, febre e dor de garganta. Em alguns casos, pode ocorrer esplenomegália ou hepatomegália com alterações enzimáticas associadas. Em casos raros, o coração ou o sistema nervoso central podem também ser envolvidos. A transmissão normalmente ocorre com o contato com a saliva. Após a infecção, o EBV permanecerá em estado dormente em algumas células do sistema imunológico.

Hematologicamente manifesta-se por aumento de monócitos e linfócitos, com mais de 10% de formas atípicas observadas no esfregaço de sangue periférico e serologicamente pelo aparecimento de anticorpos contra o vírus Epstein-Barr (VCA IgG e sobretudo VCA IgM).

Malária

A malária é provocada por um parasita hemoflagelado, o *Plasmodium*, sendo o *Plasmodium falciparum* responsável pela maioria dos casos graves ou fatais. Esse parasita é transmitido através da picada do mosquito fêmea. Uma vez no organismo, o parasita vai multiplicar-se no fígado, infetando os glóbulos vermelhos do sangue^{71,72}. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 3,3 mil milhões de pessoas estão em risco de contrair malária durante a sua vida, em particular nos países mais desfavorecidos. Estima-se que a incidência anual desta doença seja superior a 500 milhões de novos casos, sendo responsável por mais de um milhão de mortes por ano. Como o mosquito que transmite o parasita é prevalente sobretudo em climas tropicais, são essas as áreas onde a malária possui maior incidência⁷³.

Em Portugal a malária permaneceu endémica até cerca de 1950, em particular nas bacias dos rios Mondego, Sado e Águeda, altura em que foi erradicado o vetor. No entanto, devido às migrações entre Portugal e os países de língua oficial Portuguesa situados em regiões endémicas (Angola, Moçambique, Guiné, São Tomé e Príncipe e Timor), a malária, na sua forma importada, continua a aparecer de forma esporádica em Portugal. Nas últimas décadas, o aumento do volume de viagens internacionais, nomeadamente para destinos tropicais, endémicos para esta doença, acarretaram também o aumento dos casos importados. Embora a maioria dos casos de malária em Portugal tenha origem externa, verifica-se que o vetor (mosquito) continua abundantemente distribuído no território Nacional. Assim, a sua presença aliada à existência de casos importados e a alterações climáticas cada vez mais acentuadas, tornam possível a ocorrência de infeções futuras.

Existem várias espécies deste parasita mas apenas cinco causam malária em seres humanos:

- *Plasmodium falciparum*, responsável pelas formas mais graves de doença;
- *Plasmodium vivax*, que causa formas de malária menos sintomáticas mas que pode permanecer no fígado até 3 anos;
- *Plasmodium ovale*, mais raro e que pode permanecer no fígado durante anos sem causar sintomas;
- *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*: muito raros e apenas encontrados em África.

O diagnóstico precoce da malária é essencial para o seu tratamento. Esse diagnóstico é feito a partir do sangue periférico por microscopia, após coloração ou por testes laboratoriais muito rápidos. Deve ser realizado sempre que existe suspeita de malária. Um diagnóstico correto e precoce permite um tratamento mais eficaz e reduz o aparecimento de resistências à terapêutica⁷⁴.

O teste é feito em amostras de sangue total, colhido com anticoagulante EDTA e tem leitura ao fim de apenas 15 minutos. No caso de ser positivo indica se a infeção é devida a *P. falciparum* ou não *falciparum*. No laboratório de urgência, em casos de fortes suspeitas de malária é realizado o teste da gota espessa. O diagnóstico da malária envolve a realização de esfregaços de sangue. Para um esfregaço de sangue é aplicada uma gota de sangue sobre uma lâmina de vidro. Em seguida é tratada com um corante especial e examinada ao microscópio. Tipicamente são preparados dois esfregaços de gota espessa e dois esfregaços finos. Estes testes são atualmente o "gold standard" para deteção e identificação de malária. Exigem a observação por um especialista experiente.

Teste Imunológico de Gravidez (TIG)

Determinação da gonadotrofina coriónica humana (β -hCG) na urina por imunocromatografia.

Amostras para análise microbiológica

Os produtos biológicos para análise microbiológica são recebidos no laboratório de urgência 24 horas por dia. Realiza-se a primocultura para garantir um resultado o mais célere possível. Para trabalhar em condições de segurança e de acordo com as boas práticas laboratoriais existe no laboratório de urgência uma câmara de fluxo laminar (LABCONCO,

Purifier Class II Biosafety Cabinet, Delta Series) onde é feita a manipulação e o tratamento das amostras para análise microbiológica.

Atividades desempenhadas no Laboratório de Serologia

Para os diagnósticos serológicos existem no laboratório vários equipamentos:

- **Liaison XL – DiaSorin:** Equipamento automatizado que utiliza a metodologia CLIA (Imunoensaios em sandwich com leitura por quimioluminescência).
- **Architect i – Abbott:** Equipamento automatizado que utiliza imunoensaios para realizar doseamentos de anticorpos.
- **VIDAS – Biomérieux:** imunoanalisador que utiliza a tecnologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).
- **Mago Plus – Diamedix:** Equipamento automatizado que prepara lâminas por imunofluorescência indireta para posterior visualização microscópica.

A imunofluorescência indireta pode ser utilizada para a determinação de anticorpos contra agentes infecciosos, utilizando antígenos específicos como substratos. Se a amostra for positiva, os anticorpos específicos do soro do doente ligam-se aos antígenos acoplados a uma fase sólida. Numa segunda fase, os anticorpos ligados são marcados com auto-anticorpos marcados com um fluorocromo e visualizados no microscópio de fluorescência.

- **Euroimmun Analyser I:** Equipamento automatizado para ensaios de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) onde são realizadas as determinações de títulos de anticorpos para *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

Os testes de ELISA baseiam-se na identificação de anticorpos por anticorpos marcados com uma enzima. O produto dessa reação enzimática é insolúvel para não difundir do local da formação. Foi inicialmente desenvolvido por Engvall & Perlman e é muito utilizado laboratorialmente como teste diagnóstico em várias doenças.

Quando o sistema imunológico é invadido por um antígeno, são formados anticorpos específicos para o neutralizar através da formação de complexos antígeno-anticorpo. A ELISA é uma técnica fundamental para avaliações imunológicas e bioquímicas, utilizada para detetar anticorpos com base em interações anticorpo-antígeno.

O procedimento baseia-se numa solução de antígeno imobilizada numa superfície sólida numa microplaca, à qual se junta soro da amostra a ser analisada em condições que permitam que os anticorpos se liguem aos antígenos imobilizados específicos. O material não ligado é lavado e o anticorpo ligado é reconhecido pela ligação a um segundo anticorpo acoplado a uma enzima que catalisa a conversão do seu substrato (cromogénico ou fluorescente). A conversão do substrato é quantificada por um leitor de placas, que mede a densidade ótica ou a intensidade de fluorescência, consoante o substrato usado.

Diagnóstico serológico de infeções por:

I. *Treponema pallidum*

A sífilis é uma infeção causada pela bactéria *Treponema pallidum*, uma espiroqueta patogénica que pode ser adquirida através de relações sexuais e transmissão vertical. Apesar da existência de antibioterapia acessível com alta eficácia para o tratamento desta infeção, continua a ser um grande problema para as autoridades sanitárias. A infeção pode ser adquirida através de relações sexuais (vaginal, oral ou anal) e/ou por transmissão vertical (da mulher grávida para o feto) e, ocasionalmente, por transfusão com sangue contaminado, embora atualmente com menor probabilidade por este ser testado antes de transfundido. A sífilis quando não tratada torna-se numa doença crónica, que progride através de múltiplos estádios, com variação nas manifestações clínicas, classificadas como: sífilis primária, secundária, latente e terciária.

Os efeitos mais graves de sífilis não tratada, são os que envolvem o sistema nervoso central e periférico originando a neurosífilis e a sífilis cardiovascular. A neurosífilis é diagnosticada em cerca de dez por centos dos doentes com sífilis não tratada, podendo-se desenvolver em qualquer dos estádios da infeção. Neurosífilis assintomática é a apresentação mais comum, resultante da invasão do sistema nervoso central e deve-se ter presente a suspeita deste diagnóstico nos doentes que já tenham sido portadores de neurosífilis, ou aos que não responderam ao tratamento da sífilis primária, secundária ou latente, assim como nos indivíduos infetados pelo HIV ou outras condições que possam comprometer o sistema imunológico.

A sífilis congénita resulta da transmissão de *T. pallidum* da mulher grávida para o feto, quer através da placenta, quer por contacto com as lesões infecciosas durante o parto.

O diagnóstico laboratorial é de grande importância sobretudo nas situações de diagnóstico clínico mais difícil. As diversas técnicas passíveis de serem utilizadas apresentam

eficácia diferente consoante o estágio da infeção (sintomático ou assintomático) e, até hoje, não existe um único teste que permita o diagnóstico eficaz em todos os estádios. Assim torna-se necessária a associação do exame clínico com os dados laboratoriais. Os testes serológicos são o método mais utilizado para diagnóstico indireto da sífilis e podem ser divididos em dois grupos: os testes não treponémicos e os testes treponémicos.

No laboratório de Serologia do CHUC é realizado inicialmente um teste de screening de anticorpos totais anti-*T.pallidum* realizado no LiaisonXL da DiaSorin por imunoensaio quimioluminescente (CLIA) em amostras de soro. A todas as amostras cujo screening seja positivo é realizado o teste Rapid Plasma Reagin (RPR) que pesquisa anticorpos anti-cardiolipina, utilizando uma suspensão de antígeno com partículas de carvão que permitem a visualização da reação do teste macroscopicamente.² É um teste de execução rápida que permite obter resultado no próprio dia e é muito útil para a monitorização do curso da doença durante e após o tratamento. A sua principal limitação é a pouca especificidade. Pode apresentar resultados falsos-positivos devido a reações cruzadas resultantes de outras infeções ou de causas imunológicas. Podem também ocorrer falsos negativos, devido à interferência de altas concentrações de anticorpos no equilíbrio da reação antígeno-anticorpo, aquando do estudo de uma amostra (fenómeno de prozona), não ocorrendo floculação.

Assim, a reatividade deste teste é confirmada com antígenos treponémicos específicos que identificam anticorpos anti-*T. pallidum*: *T. pallidum* Haemmagglutination Assay (TPHA) e o teste de imunofluorescência indireta (FTA-Abs).

O teste TPHA é um teste de aglutinação, que utiliza eritrócitos de peru ou galinha, sensibilizados com antígeno de *T. pallidum*, o qual irá ligar-se ao anticorpo específico se presente no soro do doente.² É de fácil execução, assim como de leitura e de interpretação do resultado. O teste FTA-Abs utiliza como antígeno, a estirpe de Nichol, de *T. pallidum* inativado, fixado em lâmina. Os anticorpos inespecíficos são removidos da amostra do doente por absorção com extratos de *Treponema Reiter*. O soro é colocado em contacto com antígeno fixado na lâmina sendo a reação posteriormente evidenciada por um anti-anticorpo humano conjugado com isocianato de fluoresceína, que permite ser visualizado no microscópio de fluorescência. Este método, requer um observador experiente e permite efetuar pesquisa de imunoglobulinas G e M (IgG e IgM) específicas em separado².

2. Herpes simplex - tipo 1 e 2

O vírus *Herpes simplex* tem elevada prevalência na população em geral. Classicamente, o herpes oral é atribuído ao vírus *Herpes simplex* tipo 1, resultando a infecção do contacto com lesões orais ou secreções infetadas; o herpes genital é atribuído ao vírus *Herpes simplex* tipo 2, resultando a infecção do contacto com lesões genitais ou secreções vaginais infetadas. Para o recém-nascido a situação mais grave ocorre quando a mãe adquire a primeira infecção genital pouco tempo antes do parto. A infecção primária materna pode ser assintomática pelo que a criança poderá vir a nascer por via vaginal numa altura em que eventualmente a mãe ainda não dispõe de anticorpos IgG que passem a placenta e protejam o feto/RN. A infecção congénita é rara mas é acompanhada de um prognóstico muito grave – microcefalia, hidrocefalia e microftalmia com mortalidade muito elevada e sequelas graves nos sobreviventes. A infecção perinatal é a mais comum – 90% dos casos de herpes neonatal são adquiridos no período perinatal. O prognóstico é também muito grave se a infecção não for tratada.

É feito o doseamento sérico dos anticorpos da classe IgG para HSV-1 e para HSV-2 e da classe IgM para HSV-1/2 no Liaison XI por metodologia CLIA.²

3. Herpes zoster

O *Herpes zoster* é causado pelo mesmo herpesvírus que causa a varicela, o Vírus *Varicela zoster*, geralmente na infância. A infecção inicial pelo vírus varicela zóster, que pode adotar a forma de varicela, termina com a penetração dos vírus nos gânglios dos nervos espinhais ou cranianos, permanecendo ali em estado latente. O vírus do *Herpes zoster* pode não voltar a produzir sintomas ou então só reativar-se muitos anos depois. Se isso ocorrer, reproduz-se a doença.

O *Herpes zoster* tem uma incidência estimada na população geral de 3,64 casos por 1000 pessoas-ano. A sua incidência aumenta a partir dos 50 anos e em estados de imunossupressão como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e neoplasias linfoproliferativas, principalmente após a instituição de quimioterapia, terapêutica com corticoides ou pós-transplante.

O doseamento sérico dos anticorpos da classe IgG e da classe IgM é realizado no Liaison XL, por metodologia CLIA. Quando existem anticorpos da classe IgM a infecção está ativa; quando existem apenas anticorpos da classe IgG o indivíduo não apresenta infecção ativa mas já teve contacto anterior com o vírus².

4. Vírus Epstein-Barr (EBV)

O vírus de *Epstein-Barr* (EBV), um dos membros dos *Herpesviridae*, descrito pela primeira vez em 1964 em culturas de células de Linfoma de Burkitt, infecta mais de 90% da população mundial. A maioria das infeções primárias pelo EBV é subclínica. As complicações agudas são raras mas potencialmente letais. O ser humano é a única fonte de contágio para o vírus que se transmite por contacto íntimo. Na idade adulta a infeção assemelha-se a uma síndrome gripal com febre, amigdalite, faringite exsudativa, hepatoesplenomegália, linfadenopatia e rash cutâneo acompanhados de linfocitose. A infeção durante a gravidez é rara porque o contacto com o vírus é muito precoce na vida. Mais de 95% das mulheres em idade fértil já teve a infeção primária. Em qualquer grupo etário a infeção primária é seguida de um estado de portador permanente. Linfócitos B infetados por EBV constituem o reservatório viral responsável pela persistência da infeção durante toda a vida do hospedeiro.

Para além da associação do EBV ao LB, verificada antes da identificação do EBV como agente etiológico da mononucleose infecciosa, outras associações a neoplasias linfóides foram descritas, culminando, em 1997, com a classificação do EBV como agente carcinogénico pela “International Agency for Research on Cancer”⁷⁵.

Embora a infeção por EBV seja comum e ubíqua, as neoplasias que se lhe associam particularmente são raras e algumas situações têm uma distribuição geográfica restrita. Estes factos sugerem que o EBV, enquanto agente tumorigénico, não é suficiente para a transformação neoplásica.

A infeção aguda é acompanhada precocemente pela produção de anticorpos contra o antígeno capsular (IgM e IgG anti VCA). Ambos os anticorpos identificam infeção recente. O anticorpo da classe IgG contra o antígeno nuclear (EBNA) indica infeção passada e exclui infeção primária e aguda. São doseados por metodologia CLIA no Liaison XL².

5. Grupo ToRC: *Toxoplasma gondii*, Rubéola e Citomegalovírus

A toxoplasmose, a rubéola e as infeções por citomegalovírus (ToRC) são geralmente doenças benignas. No entanto, quando as mulheres são infetadas durante a gravidez, as consequências para o feto podem ser dramáticas^{76,77,78}.

O rastreio serológico da infeção por *Toxoplasma gondii* assume particular importância em dois grandes grupos: as mulheres grávidas ou em idade fértil e os imunodeprimidos^{77,79,80}.

Em Portugal é realizado rastreio para a toxoplasmose na consulta pré-concepcional ou na primeira consulta da gravidez. Se a mulher tiver título de IgG positivo, a análise não é

repetida. Caso tenha IgG negativa a serologia deve ser repetida uma vez por trimestre para detetar uma eventual seroconversão durante a gravidez. Esta política tem como objetivo final minorar os efeitos catastróficos de uma infeção fetal. A prevenção primária é um importante meio de prevenir a infeção reduzindo, segundo alguns autores, a taxa de seroconversão em 60%. Hoje em dia a mulher grávida sabe o que é a toxoplasmose e o modo de a evitar mas a infeção continua a ser uma grande preocupação para obstetras e neonatologistas/pediatras pela complexidade de diagnóstico e terapêutica e pelas possíveis graves consequências para o feto e recém-nascido. Em Portugal tem-se vindo a assistir a uma diminuição da taxa de seroprevalência nas mulheres em idade fértil⁷⁶.

As complicações neurológicas são habituais nos doentes imunodeprimidos. Todos os níveis do sistema nervoso podem estar envolvidos, desde o encéfalo, à medula espinhal e ao sistema nervoso periférico. As complicações cerebrais são as mais frequentes, sendo a toxoplasmose e o linfoma as causas principais de lesão parenquimatosa cerebral na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A toxoplasmose é a infeção oportunista cerebral mais frequente nos doentes com infeção por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)⁸⁰. A mielopatia é uma forma muito rara de apresentação da infeção por *Toxoplasma gondii*, com a exceção da toxoplasmose congénita; no entanto, deve ser considerada no diagnóstico diferencial dos doentes com infeção VIH que apresentam sintomatologia de lesão intramedular⁸⁰.

São usados três marcadores para um diagnóstico preciso da toxoplasmose: é feito o doseamento das IgG para determinar a presença de imunidade específica e o doseamento dos anticorpos do tipo IgM que são um marcador precoce e sensível de infeção aguda. Estes parâmetros são feitos no Architect por imunoensaio².

Na mulher grávida, sempre que haja anticorpos do tipo IgM, é feita também a determinação da avidéz de IgG. As IgG são inicialmente de baixa avidéz, mas evoluirão para alta avidéz alguns meses após a infeção primária. Assim, um alto índice de avidéz IgG permite descartar a infeção recentemente adquirida.² A determinação da avidéz é uma técnica simples que permite diferenciar os anticorpos de avidéz fraca dos anticorpos de elevada avidéz. A deteção de anticorpos de elevada avidéz é uma forte indicação de uma infeção primária de mais de 3 meses, ao passo que a deteção de anticorpos de avidéz fracos é uma forte indicação de uma infeção primária de menos de 3 meses. Esta determinação é feita por tecnologia ELFA no VIDAS. A confirmação de uma infeção materna por *Toxoplasma* pode justificar a interrupção da gravidez, no quadro da lei vigente⁷⁶.

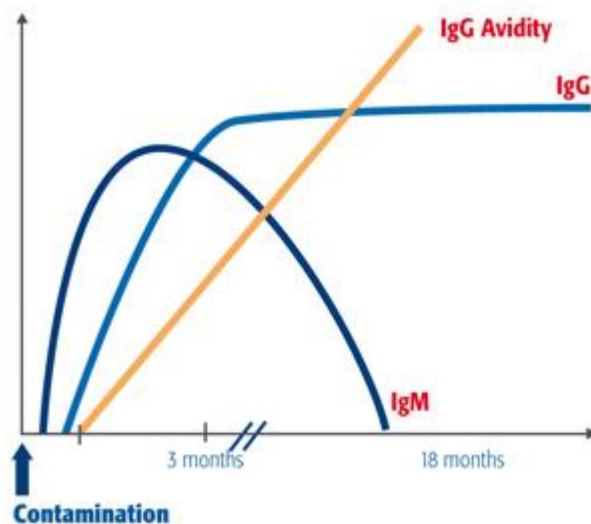


Figura 7: Gráfico que ilustra a evolução do título de anticorpos durante o processo infeccioso por *Toxoplasma gondii*.

O Homem é o único reservatório do vírus da rubéola. A transmissão ocorre por contacto direto com as secreções nasofaríngeas de pessoas infetadas. O período de maior contágio situa-se aproximadamente entre uma semana antes e uma semana depois do aparecimento do rash. O período de incubação é de 14-21 dias.

Quando a infeção ocorre na gravidez, a placenta é atingida, colocando em risco o feto, cujo futuro pode ficar comprometido, podendo ocorrer aborto espontâneo, nado-morto, malformações congénitas ou recém-nascido aparentemente normal. A intensidade do envolvimento fetal parece depender da idade gestacional, da agressividade do vírus e da suscetibilidade racial ou genética. A transmissão fetal é mais frequente no primeiro trimestre, parecendo que a placenta madura funciona como barreira à passagem do vírus, condicionando infeções fetais menos graves, à medida que a idade gestacional aumenta.

A infeção pelo vírus da Rubéola durante a gravidez pode causar Síndrome de Rubéola Congénita, doença de declaração obrigatória, tendo esta patologia um grave prognóstico fetal.

O primeiro teste serológico deve ser realizado antes da conceção, mesmo se a mulher foi vacinada. Se a mulher não estiver imunizada, deverá ser vacinada. Embora seja pequeno o risco de infeção fetal imediatamente após a vacina, desaconselha-se a gravidez por um período de 3 meses pós- vacinação.

São doseados os títulos de IgG e de IgM por imunoensaio no Architect. Quando ambos os títulos são negativos, não há imunidade. Valores elevados apenas de IgG significam

imunidade bem estabelecida. Valores muito baixos de IgG devem ser repetidos 2 a 3 semanas mais tarde. Se se verificar um aumento de 4 vezes, ou mais, no título ou o aparecimento de IgM, conclui-se que há infecção ativa. Se os valores de IgG se mantiverem estáveis, trata-se de imunidade antiga. Quando ambos os títulos (IgG e IgM) são positivos confirmam infecção evolutiva. A confirmação de uma infecção materna por rubéola pode justificar a interrupção da gravidez, no quadro legal vigente.

O Citomegalovirus (CMV) é um vírus da família *Herpesviridae*, também conhecido por Herpes vírus 5 e caracterizado por um longo ciclo de replicação e uma multiplicidade de tempos de latência. O CMV é a principal causa de infecção congénita, afetando cerca de 0,2 a 2,2% dos nados-vivos em todo o mundo, variando consoante o país e as diferentes classes socioeconómicas. A incidência da infecção congénita a CMV é elevada porque a transmissão materno-fetal pode ocorrer após a infecção primária ou recorrente. A presença de anticorpos maternos não evita a transmissão de CMV para o feto, mas reduz a transmissão e a possibilidade de sequelas.

A suspeita clínica de infecção materna por CMV deve ser confirmada pelo diagnóstico laboratorial pela verificação de IgM específica.

São doseados os títulos dos anticorpos específicos das classes IgG (Imunoensaio) e IgM (ELFA). Quando ambos são negativos, não há imunidade. Quando apenas a IgG é positiva, existe imunidade. Valores muito baixos de IgG devem ser repetidos 4 semanas mais tarde. Quando ambos os títulos são positivos, pode confirmar-se infecção evolutiva. A confirmação de uma afeção fetal por CMV pode justificar a interrupção da gravidez, no quadro legal vigente.

6. *Borrelia burgdorferi*

A Borreliose de Lyme é uma zoonose de reconhecida importância médica a nível mundial. Esta infecção continua sub-diagnosticada em Portugal devido ao acentuado polimorfismo e à complexa confirmação laboratorial dos agentes causais, espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato*.⁸¹ Trata-se de uma doença multissistémica complexa, reativa, infecciosa e crónica, suscetível de apresentar três fases no decurso da sua evolução, as quais se traduzem, geralmente, por manifestações clínicas na pele (eritema migrante, linfocitoma borreliano e acrodermatite crónica atrófica), no coração (cardite de Lyme), no sistema nervoso central (neuroborreliose) e articulações (artrite de Lyme).

O diagnóstico é essencialmente clínico, baseado nos sinais, sintomas e história de contacto com o vetor, sendo complementado por confirmação laboratorial⁸¹.

É feita a determinação dos títulos de IgG e de IgM em amostra de soro e de líquido cefalorraquidiano, por metodologia CLIA. Podem ocorrer resultados falso-positivos devido a reações cruzadas com outras patologias, tais como a mononucleose infecciosa, doenças auto-imunes (presença do fator reumatoide) e infeção por outras espiroquetas como *Treponema pallidum*².

7. *Brucella spp*

As bactérias pertencentes ao género *Brucella* são pequenos cocobacilos Gram-negativos não capsulados, sem capacidade de locomoção e de formar esporos, parasitas intracelulares facultativos. O género *Brucella* é composto atualmente por sete espécies: *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis* e, mais recentemente, *Brucella maris*.⁸² A brucelose humana pode ser causada por uma de quatro espécies: *Brucella melitensis*, ocorrendo mais frequentemente na população geral, sendo mais invasiva e patogénica e cujos reservatórios são as cabras, as ovelhas e os camelos; *Brucella abortus*, presente no gado bovino; *Brucella suis* e *Brucella canis*, transmitidas pelos suínos e pelos cães, respetivamente⁸².

Uma vez que a sintomatologia da brucelose é inespecífica, é importante, para a suspeita clínica, obter uma história detalhada, que inclua a ocupação, o contacto com animais, viagens a áreas endémicas e a ingestão de alimentos de risco (produtos lácteos não pasteurizados, por exemplo). O hemograma é pouco útil, podendo demonstrar anemia, contagem de leucócitos normal ou baixa, com linfocitose relativa e trombocitopenia. A proteína C reativa (PCR) está geralmente elevada e pode haver elevação das provas hepáticas, também inespecífica. Assim, o diagnóstico definitivo obtém-se, apenas, pelo isolamento do agente ou pela identificação de anticorpos⁸².

Quando a confirmação bacteriológica não é possível, o diagnóstico baseia-se na deteção de anticorpos específicos. O teste de rosa de Bengala é um método de rastreio rápido que consiste numa prova de aglutinação que utiliza o antigénio brucélico corado de Rosa de Bengala, é de fácil execução e leitura rápida. Tem o inconveniente de não fornecer resultados quantitativos.² Todos os resultados positivos são confirmados pelo teste de aglutinação sérica de Wright, realizado em tubo com resultados ao fim de 24 horas de incubação. Este teste tem uma utilidade diminuta na primeira semana de doença, já que os títulos de anticorpos considerados significativos (superiores a 1/160) geralmente só surgem após a segunda semana. Os testes devem repetir-se após duas a quatro semanas, já que a subida do título é a forma mais segura de diagnóstico².

8. *Chlamydia trachomatis*

A infeção sexualmente transmissível (IST), causada por *Chlamydia trachomatis*, é considerada mundialmente como um importante problema de saúde pública, porque pode causar infertilidade e morbidade a longo termo, existindo a possibilidade de transmissão ao recém-nascido de mãe infetada.

É o principal agente de uretrites e cervicites não-gonocócicas, infeções que frequentemente são assintomáticas (70% nas mulheres, 50% nos homens). O carácter silencioso da infeção constitui um fator de risco pessoal e social associado à difusão da doença. A nível pessoal, a ausência de tratamento pode traduzir-se em complicações graves, sobretudo na mulher jovem, como a doença inflamatória pélvica crónica, infertilidade e gravidez ectópica; no homem também pode determinar redução de fertilidade. O rastreio das infeções assintomáticas na população jovem sexualmente ativa é premente e faz parte do Programa Europeu de controlo da *Chlamydia trachomatis*. Portugal não dispõe de um programa de rastreio para as infeções por *C. trachomatis*, mas a sua notificação tornou-se obrigatória a partir de abril de 2014. A sua determinação laboratorial é realizada por ELISA.

9. *Chlamydia pneumoniae*

A *Chlamydia pneumoniae*, foi reconhecida como agente etiológico de infeção respiratória no ser humano, pela primeira vez em 1985.⁸³ Atualmente é identificada como um agente de pneumonia atípica e infeção respiratória alta⁸⁴⁻⁸⁶, estimando-se que 5 a 15% de todos os casos de pneumonia se associem a *Chlamydia pneumoniae*.^{87,88} O único serotipo identificado até à data denomina-se TWAR, nome derivado dos primeiros dois isolamentos realizados em humanos em Taiwan em 1965, e em Seattle nos anos oitenta.^{83,84} Muitos aspetos relacionados com a patogénese deste agente são ainda mal compreendidos. A *Chlamydia pneumoniae* é uma bactéria intracelular obrigatória, com um ciclo de vida bifásico que envolve duas formas morfológicas altamente especializadas: o corpo elementar - forma extracelular, infecciosa, que é fagocitada pela célula hospedeira, e o corpo reticular - forma intracelular, metabolicamente ativa. Dois a três dias depois da invasão celular, a maioria dos corpos reticulares reorganizam-se como corpos elementares que podem sair da célula permitindo a infeção de novas células hospedeiras⁸⁹.

10. *Mycoplasma pneumoniae*

O *Mycoplasma* é o mais pequeno microrganismo de vida livre que atualmente se conhece. Sendo descrito no grupo das bactérias, o fato de não possuir parede celular aproxima-o dos vírus e confere-lhe uma total insensibilidade aos antibióticos β -lactâmicos. É limitado por uma lâmina tripla Gram negativa e cresce lentamente em meio artificial.^{90,91} Do género *Mycoplasma* conhecem-se, hoje, mais de 60 espécies. O *Mycoplasma pneumoniae* apresenta uma distribuição ubíqua sendo prevalente nas zonas temperadas.

A pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae* representa cerca de 30 a 50% das pneumonias atípicas da criança.⁹¹ A sua maior incidência observa-se no grupo etário dos 5 aos 14 anos no qual constitui, a par do *pneumococcus*, a principal causa de pneumonia da comunidade infantil⁹¹.

11. *Rickettsia conorii*

A febre escaro-nodular, também conhecida por febre da carraça, febre botonosa ou febre mediterrânica, é uma zoonose de carácter endémico com predomínio estival nos países da orla mediterrânica. A transmissão accidental ao homem da *Rickettsia conorii* faz-se habitualmente através do artrópode *Rhipicephalus sanguineus* (carraça do cão)⁹².

As primeiras descrições de febre escaro-nodular foram efetuadas em 1910 por Conor e Bruch, na Tunísia. Em Portugal, Delfim Pinheiro identifica e descreve, em 1923, os primeiros casos clínicos e designa a doença de “Pintador”, realçando assim a erupção e dor. Na década de 30, Ricardo Jorge, com os seus trabalhos, contribui para a divulgação desta entidade e designa-a por febre escaro-nodular⁹².

Pertence à família *Rickettsiaceae*, é um parasita intracelular obrigatório que partilha características dos bacilos gram-negativos. O seu angiotropismo para as células endoteliais do hospedeiro produz necrose das células, trombose, disfunção orgânica e, em regra, exantema. Em Portugal existem duas estirpes responsáveis pela doença: a *R. conorii* Malish e a estirpe *Israeli ticktyphus*⁹³.

O diagnóstico laboratorial faz-se por imunofluorescência indireta, que doseia os títulos dos anticorpos para a *Rickettsia conorii*. Recomenda-se a realização de 2 doseamentos, com 7 a 10 dias de intervalo, pois as colheitas muito precoces poderão ser negativas².

12. *Coxiella burnetii*

As primeiras referências à febre Q datam de 1935, quando o então Diretor do Laboratório de Microbiologia e Patologia do Departamento de Saúde de Queensland (Austrália), Edward Holbrook Derrick, foi convidado a investigar o aparecimento de uma doença febril que afetava os trabalhadores do matadouro público de Cannon Hill, em Brisbane. No seu trabalho clássico, o autor relatou uma série de casos dessa patologia que, dada a sua etiologia incerta, denominou por *Query fever*.⁹⁴ O agente implicado na febre Q viria, pouco depois, a ser isolado e identificado como uma rickettsia com base em algumas características morfológicas e bioquímicas.^{95,96} Nos trabalhos da época encontram-se alusões a *Rickettsia burnetii* ou *R. diaporica*. A intensa investigação gerada em torno deste agente colocou, no entanto, em evidência algumas particularidades biológicas díspares das outras rickettsias, determinando a sua reclassificação no novo género *Coxiella*, com a designação de *Coxiella burnetii*, em homenagem a Cox e Burnet, investigadores responsáveis pelo seu isolamento⁹⁷.

A febre Q é uma zoonose de distribuição mundial causada pela *Coxiella burnetii*. Esta doença caracteriza-se por um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem ir desde uma síndrome febril auto limitada até à endocardite e ainda a outros quadros com compromisso orgânico grave, potencialmente fatais. Em Portugal, a doença é de notificação obrigatória, mas defende-se que a sua incidência real possa estar subestimada.

A infeção humana é adquirida essencialmente pela inalação de aerossóis ou poeiras contendo esporos do agente resultantes do contacto direto com animais infetados e seus produtos ou com o ambiente contaminado por estes. A alta resistência do microrganismo às condições ambientais e a possibilidade de difusão por correntes de ar, pode também originar infeções indiretas, de diagnóstico difícil pela ausência de epidemiologia compatível.

Os testes laboratoriais específicos são imprescindíveis, visto ser virtualmente impossível o diagnóstico definitivo da febre Q baseado apenas nos aspetos clínicos da doença. O teste realizado é indireto, deteta anticorpos produzidos na sequência da infeção por imunofluorescência indireta.

13. *Legionella spp*

Identificada em 1976, a *Legionella* é um microrganismo cada vez mais reconhecido como causa de pneumonia, nomeadamente de formas graves. As bactérias deste género são cocobacilos com flagelos polares, intracelulares obrigatórios e que coram pouco (ou mesmo não coram) pelo método de Gram. Existem mais de 48 espécies de *Legionella*, mas menos de

20 causam doença humana. A *Legionella pneumophila* é a mais patogénica. A virulência e a capacidade de infeção intracelular são facilitadas pela presença de flagelos e de antigénios de superfície. Apesar de existirem mais de 70 serogrupos da *Legionella pneumophila*, o serogrupo I tem sido identificado em mais de 80% das Legioneloses.

Laboratorialmente salienta-se leucocitose com neutrofilia, trombocitose, coagulação vascular disseminada, elevação da velocidade de sedimentação globular e da proteína C reativa, das transaminases e creatinase; hipofosfatémia, proteinúria, hematuria e hiponatrémia.

O diagnóstico diferencial faz-se com outros microrganismos etiológicos das pneumonias de “agentes atípicos”: *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pneumocystis carinii*, fungos, vírus. O diagnóstico exige elevado grau de suspeição, de modo a proceder-se à sua pesquisa, que não é feita por rotina.

A pesquisa de anticorpos no soro por Imunofluorescência Indireta (IFI). Apesar da utilidade da aplicação do diagnóstico serológico, em particular em estudos de avaliação de prevalência da doença, estes testes continuam a ter algumas limitações. É necessário obter sempre duas amostras de sangue do doente, colhidas com pelo menos 10 dias de intervalo, pois a cinética dos anticorpos tem mostrado grandes variações, mesmo em casos de diagnóstico feito com isolamento do agente. A especificidade não é muito elevada pois continuam a identificar-se resultados falsamente positivos, devido a reações cruzadas com outras bactérias (muitas delas causadoras também de pneumonia)².

A seroconversão, com um segundo título igual ou superior a 128, é considerada como diagnóstico de “caso confirmado”. Uma seroconversão para outra espécie ou serogrupo bem como um título único superior ou igual a 256 é neste momento considerado como diagnóstico de “caso provável”.

Amostras enviadas para o Exterior

Para além dos parâmetros já referidos, existem outras análises serológicas passíveis de ser requisitadas pelos clínicos do CHUC, com base na sintomatologia específica dos doentes, como por exemplo anticorpos para: Vírus Humano tipo 6 ou 8 (VHH6 e VHH8), histoplasma, parotidite, *Bartonella spp*, *Listeria spp* e *Francisella tularensis*. Apesar de não serem realizados neste laboratório, porque o volume de serviço não justifica a implementação das técnicas, é da responsabilidade do pessoal técnico deste serviço a correta preservação, acondicionamento e o encaminhamento destas amostras em condições ótimas para o Instituto Doutor Ricardo Jorge, em Lisboa, onde são efetuadas.

As amostras para pesquisa de anticorpos específicos para *Leptospira spp* são enviadas para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Caracterização do Laboratório de Saúde Pública

O estágio decorreu entre 1 de abril de 2015 e 31 de dezembro de 2017 na valência de microbiologia das águas do Laboratório de Saúde Pública da Guarda (LSP) que está integrado na Unidade de Saúde Pública da Unidade Local de Saúde da Guarda, cuja direção técnica está a cargo da Dra. Paula Lourenço.

A nível dos recursos humanos, a equipa do LSP é constituída por três técnicas superiores, sete técnicas superiores de Análises Clínicas e Saúde Pública e por duas assistentes operacionais.

O LSP desenvolve a sua atividade no âmbito da avaliação da qualidade da água nas vertentes físico-química e microbiológica, de acordo com as exigências da legislação nacional e comunitária e com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), numa abordagem de problemas ambientais que representam risco para a saúde humana, nomeadamente:

- Prestação de serviço analítico, dando prioridade a planos de vigilância e monitorização de fatores de risco, em articulação com Serviços de Saúde e outros com âmbito alargado de utilização pública;

- Prestação de serviço de controlo da qualidade em vários tipos de águas: de consumo, águas minerais naturais, de nascente e termais, águas naturais doces (águas superficiais, subterrâneas e balneares), águas de processo (hemodiálise, para uso industrial e torres de arrefecimento) e de piscinas, à comunidade onde se insere e aos distritos de Castelo Branco e Viseu;

- Participação em projetos de pesquisa e investigação propostos pela Direção Geral de Saúde, pela Administração Regional de Saúde do Centro, da Unidade Local de Saúde e/ou em articulação com a Universidade da Beira Interior, Instituto Politécnico da Guarda e outras entidades públicas ou privadas;

- Orientação de estágios curriculares na área da Saúde Pública de alunos da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Escola Superior de Saúde de Bragança.

Acreditação pelo IPAC

O LSP é o único laboratório de Saúde Pública na zona Centro do país acreditado pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC), pela ISO 17025:2005 desde 2011, com o anexo técnico L0570-1, tendo sido o último emitido a 03 de janeiro de 2018 onde constam 31 parâmetros acreditados.

Evolução do N° Parâmetros Acreditados

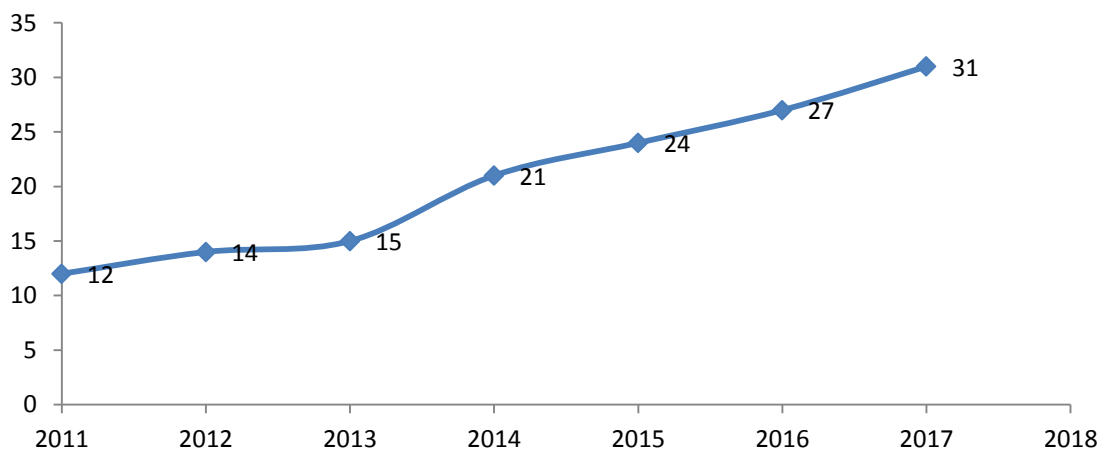


Gráfico I: Esquema gráfico da evolução do número de ensaios acreditados pelo LSP

O IPAC é o organismo nacional de acreditação requerido pelo Regulamento (CE) n.º 765/2008. Os serviços de acreditação prestados pelo IPAC estão descritos no Regulamento Geral de Acreditação e Procedimentos conexos, bem como as regras, critérios e metodologias aplicáveis. O IPAC é membro da infraestrutura europeia de acreditação, a European cooperation for Accreditation (EA), bem como das estruturas mundiais de acreditação, a International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) e o International Accreditation Forum (IAF)⁹⁸.

A acreditação consiste na avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade. A atividade de acreditação está sujeita a legislação comunitária que obriga a um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação pelos pares. Em consequência, cada Estado-Membro da União Europeia designou um único organismo nacional de acreditação, tendo em Portugal essa missão sido atribuída ao IPAC, conforme disposto no Decreto-lei n.º 23/2011, de 11 de Fevereiro⁹⁹.

A avaliação da conformidade consiste na realização de ensaios, calibrações, inspeções e certificações. As atividades de avaliação da conformidade visam demonstrar que um dado processo ou serviço cumpre com os requisitos que lhe são aplicáveis. Nalguns casos a avaliação da conformidade é legalmente exigida, normalmente relacionada com a segurança desse produto ou serviço. A avaliação da conformidade pode também ser uma exigência contratual ou uma garantia que um dado produto ou serviço se adequa ao uso pretendido.

Essencialmente, a acreditação de um laboratório serve para ganhar e transmitir confiança na execução das atividades técnicas, ao confirmar a existência de um nível de competência técnica mínimo, reconhecido internacionalmente. A acreditação funciona como

um regulador técnico, garantindo que a otimização de custos não diminui a competência técnica, nem compromete a confiança na execução das atividades que estão acreditadas.

Uma vez que a acreditação é feita de acordo com metodologias harmonizadas em todo o Mundo, existem Acordos de Reconhecimento Mútuo (EA, IAF, ILAC) entre os organismos de acreditação, facilitando a livre circulação de bens e serviços abrangidos pelas acreditações. A acreditação é um fator de competitividade das entidades acreditadas e das empresas que com elas trabalham. A existência no país de uma infraestrutura de entidades acreditadas, reconhecida internacionalmente, permite ainda ajudar na captação de investimento de alto valor acrescentado ao garantir que existe em Portugal tecnologia credível e qualificada.

A Norma ISO 17025

A acreditação consiste na demonstração e reconhecimento, através de uma avaliação efetuada por um Organismo de Acreditação, da competência técnica e de gestão de uma entidade para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade. No caso dos laboratórios em efetuar ensaios ou calibrações. A acreditação de um laboratório não é uma certificação, como muitas vezes é considerado (i.e. certificação de sistemas de gestão da qualidade ISO 9001). Uma diferença fundamental é que a acreditação, normalmente, é um requisito legal para o exercício de determinada atividade de avaliação da conformidade, ao contrário da certificação que é maioritariamente uma opção voluntária das empresas. No entanto existem requisitos em comum entre a norma de referência da acreditação de laboratórios, norma ISO/IEC 17025 e a norma ISO 9001 que tem servido de base para o desenvolvimento das normas de sistemas de gestão e respetiva certificação de empresas. Essa foi a preocupação dos organismos de normalização.

A conformidade do sistema de gestão da qualidade de um laboratório com os requisitos da ISO 9001 não é suficiente para demonstrar a sua competência técnica na realização de ensaios ou calibrações. Assim como a conformidade com os requisitos da ISO/IEC 17025 não implica a conformidade com todos os requisitos da ISO 9001^{100,101}.

A norma ISO/IEC 17025 está dividida em duas grandes partes, Secção 4 - Requisitos de Gestão e Secção 5 – Requisitos Técnicos. Esta define uma metodologia harmonizada, com validade para a acreditação em Portugal, na Europa e internacionalmente já que existem acordos de reconhecimento mútuo entre os organismos de acreditação, facilitando assim a internacionalização das empresas.

Microbiologia das águas

Praticamente todas as águas naturais contêm bactérias devido à sua exposição ao ar e ao solo. Na sua maioria, são microrganismos inofensivos, cujo número e natureza variam consideravelmente de acordo com o lugar e as condições ambientais. Ao longo do seu percurso, as águas naturais, superficiais ou subterrâneas, podem ser contaminadas com microrganismos patogênicos. Alguns destes organismos podem sobreviver longos períodos de tempo em águas naturais, não necessitando do homem como hospedeiro, enquanto outros possuem uma capacidade de sobrevivência muito reduzida. Para garantir a ausência de agentes patogênicos, a água destinada ao consumo humano deve ser analisada periodicamente do ponto de vista microbiológico.

A aproximação ideal a este problema seria a pesquisa de todos os microrganismos causadores de doenças intestinais e outras, como principal determinação a efetuar numa análise bacteriológica de uma água de abastecimento. Na prática corrente, esta pesquisa só se realiza em casos excepcionais pela dificuldade relativa que apresenta; se presentes numa água, as bactérias patogênicas encontram-se em número restrito e os métodos destinados ao seu isolamento e quantificação são frequentemente longos e complexos.

O LSP desenvolve atividades na área da vigilância e do controlo de qualidade de águas que compreende os ensaios bacteriológicos contemplados na Legislação em vigor. Tem como principal atividade a análise microbiológica de águas para consumo humano, águas de origem subterrânea e superficial, águas de piscinas, águas minerais de nascente e termais, águas de processo e águas balneares. Todas as análises são realizadas de acordo com a respetiva legislação em vigor.

Desta forma poderá responder às exigências legais para prestar serviços à comunidade, efetuar análises microbiológicas para entidades públicas e entidades privadas.

Águas analisadas pelo LSP desde 2015

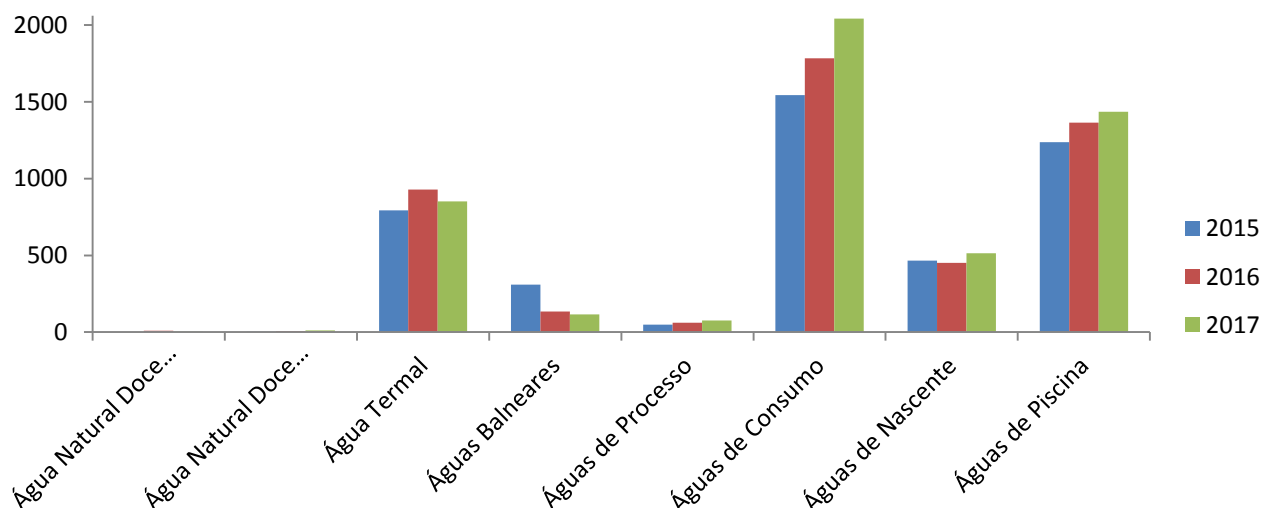


Gráfico 2: Número de águas analisadas no LSP desde 2015

Análise Microbiológica das Águas

As águas são analisadas consoante a sua origem e o fim a que se destinam, existindo, assim, vários perfis de análise. Habitualmente as amostras são colhidas e transportadas ao laboratório por Técnicos de Saúde Ambiental (TSA) certificados, que garantem a representatividade e a integridade das amostras de acordo com a norma ISO 19458 e cumprindo os procedimentos internos.

Esporadicamente as amostras são colhidas e transportadas ao laboratório pelo próprio cliente, sem que o LSP tenha qualquer envolvimento no processo de colheita.

Todas as amostras para análise microbiológica são colhidas para frascos de polietileno estéreis, com tiosulfato de sódio, agente neutralizante de biocidas (cloro, boro, por exemplo), adquiridos comercialmente prontos a usar.

Neste momento o LSP encontra-se em fase de acreditação dos procedimentos de colheitas, um projeto piloto que conta com a colaboração do TSA afeto ao LSP e de 3 TSA da Unidade de Saúde Pública da ULS da Guarda.

O procedimento de colheitas de amostras de água é um elemento importante do programa de controlo da qualidade da água, porque o resultado da análise não corresponderá ao valor real, mesmo que utilizando um método analítico rigoroso, se a amostra não for representativa da água a controlar.

O controlo analítico da água inicia-se com a colheita da amostra, devendo esta ser efetuada de modo correto, colhida no recipiente adequado e nas condições de conservação e transporte apropriadas até à análise no laboratório.

A receção das amostras á chegada ao laboratório reveste-se de grande importância e é fundamental que seja seguido o protocolo para evitar erros. São realizadas várias verificações pelos técnicos do LSP aquando da receção de amostras de água, nomeadamente:

- 1 - Verificação da requisição que acompanha as amostras: verificar se a requisição está preenchida corretamente e de forma legível e confirmar a identificação do Técnico de Saúde Ambiental ou do técnico de colheitas responsável pela colheita e transporte das amostras.
- 2 - Controlo das condições da amostra: as amostras devem ser transportadas e armazenadas de acordo com o procedimento que descreve as condições de preparação e conservação de amostras.
- 3 - Verificar se foi usado o frasco correto para a colheita e se o volume de amostra é o indicado.
- 4 - Verificar se o frasco está fechado corretamente para garantir que a amostra é preservada adequadamente.
- 5 - Verificar se temperatura da amostra à chegada ao LSP é inferior ou igual à temperatura na colheita, de acordo com a norma ISO 19458¹⁰².
- 6 - Registo das amostras recebidas: registar todas as informações relevantes inerentes às amostras e respetiva mala de transporte e assinar e datar as requisições, atestando a conformidade da amostra.

Águas analisadas no LSP

Águas de consumo

As águas que se destinam ao consumo são regulamentadas pelos Decretos-Lei n.º306/2007¹⁰³ e n.º152/2017¹⁰⁴, que estabelecem o regime da qualidade da água destinada ao consumo, procedendo à revisão do Decreto-Lei n.º243/2001, de 5 de Setembro, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição.

Nos termos definidos no regime legal de controlo da qualidade da água para consumo em vigor, as entidades gestoras dos sistemas de abastecimento público devem dispor, no início de cada ano civil, de um Programa de Controlo da Qualidade da Água para consumo (PCQA) aprovado pela ERSAR. Neste momento o LSP não efetua PCQA, as análises às águas destinadas ao consumo são realizadas apenas no âmbito dos programas de vigilância sanitária das Unidades de Saúde Pública com quem tem protocolos.

A via mais frequente de contaminação ocorre através de esgotos domésticos contendo excrementos com numerosos microrganismos, pertencentes a espécies patogénicas importantes. A abordagem geralmente utilizada é a pesquisa de microrganismos, normalmente presentes nos dejetos humanos e de animais que se tornam assim indicadores de contaminação fecal. Este é um princípio universalmente aceite para a vigilância e avaliação da qualidade microbiológica de água para consumo.

Tabela 6: Perfil laboratorial de rotina para análise microbiológica de águas de consumo

Perfil de Rotina das Águas destinadas ao Consumo		
Parâmetro	Metodologia	Volume Amostra
Microrganismos cultiváveis a 22°C e a 37°C	Incorporação	1 mL
Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	Número Mais Provável	100mL
Enterococos fecais	Número Mais Provável	100mL
<i>Clostridium perfringens</i>	Filtração por Membrana	100mL

Utilizam-se como indicadores de contaminação fecal: a bactéria *Escherichia coli* e espécies próximas agrupadas sob a designação de coliformes, os estreptococos fecais e os *Clostridium* sulfito-redutores, uma vez que todos estes microrganismos obedecem aos seguintes critérios:

- Encontram-se apenas no conteúdo intestinal de animais de sangue quente;
- Existem em densidades que excedem consideravelmente as dos organismos patogénicos presentes em indivíduos infetados;
- Verifica-se uma correlação positiva de uma contaminação fecal e a presença do microrganismo indicador;
- A sua persistência na água é igual ou superior à dos microrganismos patogénicos mais persistentes;
- Apresentam taxas de mortalidade semelhantes às dos patogénicos mais resistentes após desinfeção ou em condições de stresse.

Águas termais

Portugal é um dos países da Europa com maior riqueza em águas termais de excelente qualidade, sendo um recurso natural com origens na Antiguidade. Este recurso é cada vez mais utilizado na prevenção e tratamento de doenças e na promoção da saúde e bem-estar. As águas termais são águas minerais naturais que têm propriedades terapêuticas com efeitos favoráveis à saúde devido às particularidades da sua composição físico-química. Este tipo de água é bacteriologicamente pura, circula a grande profundidade e a sua composição química é estável. A pureza bacteriológica é garantida através do controlo e vigilância nas diferentes captações. Toda a circulação é feita em tubagem de aço inox com soldaduras lisas de forma a evitar o alojamento de impureza e toda a água consumida pelos aquistas obedece a um rigoroso programa de análises coordenado pela Direção Geral de Saúde (DGS) por forma a garantir a sua pureza. As características microbiológicas das águas termais estão descritas na Portaria nº1220/2000 de 29 de Dezembro¹⁰⁵.

Tabela 7: Perfil laboratorial de rotina para análise microbiológica de águas termais

Perfil Laboratorial de Rotina das Águas Termais		
Parâmetro	Metodologia	Volume
Microrganismos cultiváveis a 22°C e a 37°C	Incorporação	1mL
Coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i>	Filtração por Membrana	250mL
Enterococos fecais	Filtração por Membrana	250mL
<i>Esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras</i>	Filtração por Membrana	50mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Número Mais Provável	250mL

Águas minerais naturais e de nascente

Em Portugal, a indústria de engarrafamento apenas extrai, acondiciona e comercializa águas minerais naturais e águas de nascente. As águas minerais naturais são de origem subterrânea, bacteriologicamente sã e de composição química estável. Diferenciam-se por poderem ser ricas em certos sais minerais e oligoelementos e pela sua pureza original estável, uma vez que provêm de aquíferos preservados pelo estabelecimento legal de perímetros de proteção. As águas de nascente são, também, águas de origem subterrânea, cujas características naturais e de pureza estão adequadas

ao consumo humano. A preservação das propriedades naturais e é, para ambos os tipos de água, obrigatória, pelo que se proíbem todos os tipos de tratamentos químicos ou de desinfecção. Em certas circunstâncias, permite-se a remoção de certos elementos indesejáveis eventualmente presentes, mas tal só pode ocorrer em condições legal e cientificamente restritas. Com efeito, nem todas as águas têm características garantidamente naturais e saudáveis para a ingestão humana. Apenas as águas minerais naturais e as águas de nascente mantêm a pureza natural, contribuindo, desta forma, para manter o equilíbrio do nosso corpo. As águas minerais naturais e as águas de nascente são as únicas águas totalmente naturais, cujo tratamento é manifestamente proibido e que chegam ao consumidor sem químicos ou aditivos.

Tabela 8: Perfil laboratorial de rotina para análise microbiológica de águas minerais naturais e de nascente

Perfil de Rotina das Águas minerais naturais e de nascente		
Parâmetro	Metodologia	Volume
Microrganismos cultiváveis a 22°C e a 37°C	Incorporação	1mL
Coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i>	Filtração por Membrana	250mL
Enterococos fecais	Filtração por Membrana	250mL
<i>Esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras</i>	Filtração por Membrana	50mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Número Mais Provável	250mL

Águas de piscinas

Nos últimos anos tem-se assistido a uma crescente utilização de piscinas, por indivíduos de todas as idades, desde bebés a idosos, devido à importância generalizada da atividade desportiva como fator de bem-estar físico e como promotora da saúde. No entanto, associados a estes locais encontram-se fatores de risco que podem ter repercussões tanto na saúde dos profissionais como na dos seus utilizadores. Os principais riscos biológicos associados às piscinas decorrem não só dos próprios utilizadores, quer por contaminação fecal ou através das suas secreções, mas também pelo facto de a água poder estar contaminada na origem. Por outro lado, valores excessivos dos produtos químicos

utilizados no tratamento da água, por si só ou em combinação com teores elevados de matéria orgânica, podem constituir, do ponto de vista químico, um risco para a saúde.

Os diplomas legais aplicáveis são os seguintes:

✓ Piscinas de utilização coletiva, Decreto-Lei n.º 141/2009, de 16 de Junho, que estabelece o regime de instalação e funcionamento das instalações desportivas de uso público¹⁰⁶.

✓ Piscinas integradas em empreendimentos turísticos - Portaria n.º 358/2009, de 6 de Abril, que estabelece os requisitos dos equipamentos de uso comum dos empreendimentos turísticos e regulamenta o Decreto-Lei n.º 39/2008, de 7 de Março (que aprova o regime jurídico dos empreendimentos turísticos). Esta Portaria refere no n.º 3 do artigo 5.º, que “As piscinas dos empreendimentos turísticos devem ter equipamentos que garantam que a qualidade da água obedece aos parâmetros definidos pelo Decreto Regulamentar n.º 5/97, de 31 de Março”¹⁰⁷.

✓ Piscinas de hidroterapia e com fins terapêuticos - “Manual de Boas Práticas de Medicina Física e de Reabilitação“, publicado pelo Aviso n.º 9448/2002 (2ª série) em 29 de Agosto e Portaria n.º 1212/2010, de 30 de Novembro que estabelece os requisitos mínimos relativos à organização e funcionamento, recursos humanos e instalações técnicas para o exercício da atividade das unidades privadas de medicina física e de reabilitação que prossigam atividades de diagnóstico, terapêutica e de reinserção familiar e socioprofissional”. O Aviso mencionado refere que “a água usada nas piscinas terapêuticas deverá ser própria, de acordo com o estabelecido no anexo II do Decreto-Lei n.º 65/97”. A água deve obedecer aos parâmetros definidos pelo Decreto Regulamentar n.º 5/97, de 31 de Março^{108,109}.

✓ Recintos com diversões aquáticas - Decreto-Lei n.º 65/97, de 31 de Março, que regula a instalação e o funcionamento dos recintos com diversões aquáticas e o Decreto Regulamentar n.º 5/97, de 31 de Março, que aprova o regulamento das condições técnicas e de segurança dos recintos com diversões aquáticas^{110,111}.

A análise microbiológica de uma água de piscina implica duas colheitas: uma em profundidade para pesquisa de bactérias presentes em todo o volume do tanque e indicadoras de contaminação fecal (microrganismos cultiváveis, coliformes totais e *E. coli* e enterococos fecais), e uma superficial para deteção de bactérias patogénicas (*Staphylococcus spp*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*), que se acumulam no filme superficial da água.

Tabela 9: Perfil laboratorial para análise microbiológica de águas de piscinas, retirada do Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas (PVSP) da DGS.

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS	EXPRESSIONO DE RESULTADOS	MÉTODOS ANALÍTICOS	VALORES DE REFERÊNCIA		PERIODICIDADE DAS ANÁLISES
			VR	VL	
Microrganismos cultiváveis 37°C-24h ⁴	UFC / 1ml	ISO 6222	≤ 100 *	-	Mensal
Bactérias coliformes ⁵	UFC/ 100 ml	ISO 9308-1 modificada	0	10	
<i>Escherichia coli</i>	UFC/ 100 ml	ISO 9308-1 modificada	-	0	
Enterococos ⁶	UFC/ 100ml	ISO 7899-2	-	0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFC/ 100 ml	ISO 12780 modificada	-	0	
Estafilococos produtores de coagulase	UFC/ 100 ml	NP-4343	-	0**	
N.º total de Estafilococos	UFC/ 100 ml	NP-4343	≤ 20 *	-	
<i>Legionella</i> ***	N.º/ 1000 ml	ISO 11731:1998	Ver Tabela 4		Trimestral

VR – Valor Recomendado; VL – Valor Limite

* O Valor Recomendado poderá ser ultrapassado uma vez por época de abertura ao público ou por ano civil.

** 0/100 ml em 90% das amostras, sendo da responsabilidade dos serviços de saúde locais efectuar a avaliação no final da época ou ano civil.

Águas de Processo

Dentro deste tipo de matriz, o LSP recebe com frequência três tipos de águas: águas de torres de arrefecimento, águas para fins industriais (indústria alimentar), águas de hemodiálise, legisladas pelo Manual de Boas Práticas de Hemodiálise (Portaria nº 1194/2001), de acordo com o qual os objetivos de uma unidade de tratamento de água para hemodiálise devem garantir um grau de purificação de água para preparação do dialisate em condições que respeitem escrupulosamente os padrões definidos e prevenir a ocorrência de acidentes agudos resultantes do mau funcionamento do equipamento ou do seu desgaste precoce através de medidas de manutenção, de deteção de avarias e de controlo de qualidade. No que respeita às análises bacteriológicas da água, devem ser realizadas pelo menos uma vez por mês e sempre que surja evidência de contaminação do sistema, deve-se submetê-lo a desinfecção e, após esta, efetuar análises bacteriológicas da água pelo menos três vezes em dias alternados até que esteja garantida a normalização da situação;

As técnicas de colheita devem ser escrupulosamente respeitadas e devem ser efetuadas nos seguintes pontos: água da rede; água antes da osmose e água após a osmose.

As águas para a indústria alimentar são analisadas da mesma forma que a água destinada ao consumo humano, uma vez que a sua proveniência é a rede de abastecimento pública.

Nas águas das torres de arrefecimento neste momento o LSP faz apenas análises relacionadas com a pesquisa de *Legionella*.

Tabela 10: Perfil laboratorial de rotina para análise microbiológica de águas de hemodiálise

Perfil de Rotina das Águas de Hemodiálise		
Parâmetro	Metodologia	Volume
Microrganismos cultiváveis a 22°C e a 37°C	Incorporação	1 mL
Coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i>	Filtração por Membrana	250mL
Enterococos fecais	Filtração por Membrana	250mL
<i>Esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras</i>	Filtração por Membrana	50mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Número Mais Provável	250mL
<i>Staphylococcus spp</i> e <i>S. aureus</i>	Filtração por Membrana	250mL

Águas Balneares

Entendem-se como águas balneares todas as águas naturais doces interiores, correntes e paradas, águas de transição (estuarinas) e águas costeiras que sejam autorizadas para uso de banhos pelas entidades competentes e ativamente promovidas a nível local, regional, nacional ou internacionalmente (ou que se pretenda que o venham a ser de futuro) e/ou não sendo áreas proibidas, sejam regularmente utilizadas para banhos por um número considerável de banhistas locais e/ou visitantes. As zonas balneares são os locais definidos/assinalados em águas balneares onde, em média, durante a época balnear, se encontre a maioria dos banhistas.

De acordo com estes pressupostos, qualquer local onde se verifique uma afluência significativa de utentes é passível de ser considerado como zona balnear e passar a ser objeto de análises periódicas que verifiquem a qualidade da sua água de acordo com a legislação vigente. Deste modo, o processo de designação de novas zonas balneares, é da competência dos órgãos de poder local que de acordo com os seus planos de desenvolvimento municipais, formalizem o pedido de classificação para a prática balnear de

determinado local junto das Direções Regionais do Ambiente e do Ordenamento do Território.

Tabela 11: Perfil laboratorial de rotina para análise microbiológica de águas balneares

Perfil de Rotina das Águas Balneares		
Parâmetro	Metodologia	Volume
Pesquisa e quantificação de <i>Escherichia coli</i>	Número Mais Provável	100mL
Pesquisa e quantificação de enterococos fecais	Número Mais Provável	100mL
Pesquisa de <i>Salmonella spp</i>	Membrana Filtrante	1000mL

Legislação em Vigor em Portugal

Água para Consumo

A Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR) tem por missão a regulação e a supervisão dos setores de abastecimento público de água às populações, de saneamento de águas residuais urbanas e de gestão de resíduos sólidos urbanos, incluindo o exercício de funções de autoridade competente para a coordenação e a fiscalização do regime da qualidade da água para consumo humano.

A ERSAR exerce os poderes de autoridade necessários à prossecução das suas atribuições, designadamente através da realização de ações de inspeção, fiscalização e auditoria. No âmbito das suas atribuições, a ERSAR emite pareceres sobre os serviços que regula e pode instaurar processos de contraordenação. Consulte os diferentes tipos de decisões e pareceres. No âmbito dos poderes regulamentares, compete à ERSAR elaborar e aprovar regulamentos com eficácia externa no quadro das respetivas atribuições, sem prejuízo de outras que venham a ser definidas por lei.

O Decreto-Lei n.º 306/2007¹⁰³ de 27 de Agosto Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, revendo o Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de Setembro, que transpôs para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 98/83/CE.

Parâmetros e valores paramétricos

Parte I — Parâmetros microbiológicos

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).	0	Número/100 ml.
Enterococos	0	Número/100 ml.

2 — Os valores paramétricos para as águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes são os seguintes:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).	0	Número/250 ml.
Enterococos	0	Número/250 ml.
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .	0	Número/250 ml.
Número de colónias a 22°C.	100	Número/ml.
Número de colónias a 37°C.	20	Número/ml.

Figura 9: Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para análise de águas para consumo, retirada do Decreto-Lei n.º306/2007.

O Decreto-Lei n.º152/2017¹⁰⁴, de 7 de dezembro altera o regime da qualidade da água para consumo humano, transpondo as Diretivas n.º2013/51/EURATOM e 2015/1787.

O Decreto-Lei n.º 306/2007¹⁰³, de 27 de agosto, que transpôs para ordem jurídica interna a Diretiva n.º 98/83/CE do Conselho, de 3 de novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, revogou o Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de setembro, devido à necessidade de adaptar a legislação nacional relativa à qualidade da água para consumo humano às obrigações da referida diretiva.

Decorridos 10 anos sobre a publicação do Decreto-Lei n.º 306/2007¹⁰³, de 27 de agosto, traduzidos na consolidação do modelo de regulação da qualidade da água em Portugal, podem constatar-se consequências globalmente muito positivas para o setor, as quais se materializam numa evolução muito positiva do indicador «água segura». Contudo, a legislação deve refletir o progresso científico e técnico, pelo que a sua revisão periódica é fundamental.

Desde 2004, a Organização Mundial da Saúde tem desenvolvido uma abordagem relativa aos planos de segurança da água, com base na avaliação de risco e nos princípios de gestão de risco estabelecidos nas suas diretrizes para a qualidade da água potável. Tais diretrizes, juntamente com a norma EN 15975-2, relativa à segurança nos sistemas de abastecimento de água destinada a consumo humano, constituem princípios reconhecidos a

nível internacional no que respeita à produção, distribuição, controlo e a análise dos parâmetros da água para consumo humano.¹¹² O anexo II do Decreto-Lei n.º 306/2007¹⁰³, de 27 de agosto, deve, por conseguinte, ser alinhado com as atualizações mais recentes destes princípios. No que diz respeito ao controlo microbiológico da água, não houve alterações a nível de parâmetros nem de valores paramétricos.

Piscinas

As amostras são ensaiadas segundo os requisitos da Circular Normativa nº14/DA de 21/8/2009 e do Decreto Regulamentar 5/97 de 31 de Março que aprova o regulamento das condições técnicas e de segurança dos recintos com diversões aquáticas^{113,114}.

Segundo o Decreto-Lei nº82/2009 de 2 de Abril, na sua alínea a) do número 3 do artigo 5º, compete às autoridades de saúde “vigiar o nível sanitário dos aglomerados populacionais, dos serviços, estabelecimentos e locais de utilização pública e determinar as medidas corretivas necessárias á defesa da saúde publica”.

No caso das piscinas e tendo em consideração os diversos perigos que poderão estar associados à sua utilização, a operacionalização destas competências deverá incluir, entre outras atividades, a vigilância epidemiológica de eventos adversos para a saúde associados à frequência de piscinas ou dos trabalhadores desses locais, a vigilância sanitária da qualidade da água dos tanques e da água para consumo humano e a verificação dos métodos de controlo da qualidade do ar em piscinas cobertas.

Nas ações de vigilância a desenvolver devem existir critérios e procedimentos uniformizados, bem como ser garantida a existência de planos de identificação, monitorização e controlo de risco, de modo a que a saúde e segurança dos utilizadores, trabalhadores e visitantes sejam asseguradas.

Os parâmetros microbiológicos que devem ser avaliados nas piscinas bem como os seus valores paramétricos estão definidos na Circular Normativa nº14/DA da Direção Geral de Saúde, conforme referido atrás no documento¹¹³.

Águas Balneares

O Decreto-Lei nº113/2012 de 23 de Maio define as normas de qualidade para águas balneares interiores, nomeadamente no que se refere aos parâmetros biológicos a analisar e aos respetivos valores paramétricos¹¹⁵.

Norma de qualidade

Águas interiores

	A	B	C	D	E
	Parâmetro	Qualidade excelente	Qualidade boa	Qualidade aceitável	Métodos de análise de referência
1	<i>Enterococos</i> intestinais em ufc/100ml	(*) 200	(*) 400	(**) 330	ISSO 7899 1 ou ISSO 7899 2
2	<i>Escherichia coli</i> em ufc/100 ml	(*) 500	(*) 1000	(**) 900	ISSO 9308 3 ou ISSO 9308 1

(*) Com base numa avaliação de percentil 95. V. anexo III.

(**) Com base numa avaliação de percentil 90. V. anexo III.

ufc — unidades formadoras de colónias.

Figura 10: Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para análise de águas balneares interiores, retirada do Decreto-Lei nº113/2012.¹¹⁵

As águas balneares são ainda reguladas pela Norma 9/2011 de 28 de Abril da Direção Geral de Saúde que define o Programa de Vigilância Sanitária das Zonas Balneares Interiores.

Águas Naturais Doces

As amostras são ensaiadas segundo os requisitos do Decreto-Lei nº236/98 de 1 de Agosto, que define as Normas de Qualidade para Proteger o Meio Aquático e Melhorar a Qualidade das Águas¹¹⁶.

Numa perspetiva de proteção da saúde pública, de gestão integrada dos recursos hídricos e de preservação do ambiente, pretende-se também com este diploma legal clarificar as competências das várias entidades intervenientes no domínio da qualidade da água, bem como conciliar esta matéria com alterações legislativas que ocorreram após a entrada em vigor do diploma em apreço e que com ele se relacionam, como sejam as alterações decorrentes dos Decretos-Leis nº 45/94, de 22 de Fevereiro, e nº46/94, da mesma data, relativos, respetivamente, ao planeamento dos recursos hídricos e ao licenciamento das utilizações do domínio hídrico.

Constituindo as águas superficiais, por princípio, um bem do domínio público e tratando o presente diploma destas águas (a par com outras já de natureza privada), fá-lo ou no âmbito do regime de licenciamento contido no Decreto-Lei nº46/94 (autorizado), ou no sentido de garantir uma atuação da Administração que preserve e melhore a qualidade das águas visando potenciar o seu uso público de uma forma que, desde logo, não ponha em causa a saúde pública.

O diploma estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. O diploma define os requisitos a observar na utilização das águas para os seguintes fins:

a) Águas superficiais ou subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano;

b) Águas para suporte da vida aquícola: águas doces superficiais para fins aquícolas — águas piscícolas: águas do litoral e salobras para fins aquícolas — águas conquícolas; águas do litoral e salobras para fins aquícolas — águas piscícolas;

c) Águas balneares;

d) Águas de rega.

São ainda definidas neste diploma as normas de descarga das águas residuais na água e no solo, visando a promoção da qualidade do meio aquático e a proteção da saúde pública e dos solos.

Águas Minerais Naturais e de Nascente

As amostras são ensaiadas de acordo com os requisitos do Decreto-Lei n.º 156/98 de 6 de Junho que estabelece as regras relativas ao reconhecimento das águas minerais naturais e as características e condições a observar nos tratamentos, rotulagem e comercialização das águas minerais naturais e águas de nascente, revogando o Decreto-Lei n.º 283/91, de 9 de Agosto^{117,118}.

O diploma define e caracteriza as águas minerais naturais e as águas de nascente e estabelece regras relativas à sua exploração, acondicionamento e comercialização. Aplica-se igualmente às águas minerais naturais extraídas do solo de um país terceiro importadas pela Comunidade, desde que devidamente reconhecidas pela autoridade responsável de um Estado membro. Não são abrangidas pelo presente diploma as águas minerais naturais exclusivamente utilizadas para fins curativos nos estabelecimentos termais.

Águas Termais

As amostras são ensaiadas de acordo com a Portaria n.º 1220/2000 de 29 de Dezembro que estabelece as regras relativas às condições a que as águas minerais naturais e as águas de nascente, na captação, devem obedecer para poderem ser consideradas bacteriologicamente próprias, nomeadamente:

As condições a que as águas minerais naturais e as águas de nascente, na captação, devem obedecer para poderem ser consideradas bacteriologicamente próprias são as seguintes:

a) Apresentarem-se isentas de:

i) Parasitas e microrganismos patogénicos;

ii) *Escherichia coli* e outros coliformes e estreptococos fecais, em 250 mL de amostra analisada;

iii) Anaeróbios esporolados sulfito-redutores, em 50 mL de amostra analisada;

iv) *Pseudomonas aeruginosa*, em 250 mL de amostra analisada;

b) O teor total em microrganismos viáveis de uma água mineral natural e de uma água de nascente deve corresponder ao seu microbismo normal e revelar uma proteção eficaz da captação contra qualquer contaminação;

c) Os teores totais de microrganismos referidos na alínea b), após cultura em meio nutritivo gelosado, não devem ultrapassar, respetivamente, 20 por mililitro a 20°C-22°C, às setenta e duas horas, e 5 por mililitro a 37°C, às vinte e quatro horas.

As condições a que as águas minerais naturais utilizadas nos estabelecimentos termais devem obedecer para poderem ser consideradas bacteriologicamente próprias são as seguintes:

a) Apresentarem-se isentas de:

i) Parasitas e microrganismos patogénicos;

ii) *Escherichia coli* e outros coliformes e estreptococos fecais, em 250 ml de amostra analisada;

iii) Anaeróbios esporolados sulfito-redutores, em 50 ml de amostra analisada;

iv) *Pseudomonas aeruginosa*, em 250 ml de amostra analisada;

v) *Legionella pneumophila*, em 1 l de amostra analisada;

b) O valor de referência para o número total de *Legionella* não *L. pneumophila* é de 100 UFC/L;

c) O teor total em microrganismos viáveis de uma água mineral natural deve corresponder ao seu microbismo normal e revelar a preservação da qualidade da água até aos pontos da sua utilização;

d) Na água mineral natural utilizada nos estabelecimentos termais, por ingestão e em contacto com as mucosas respiratórias, oculares e com outras mucosas internas, os teores totais de microrganismos referidos na alínea c), após cultura em meio nutritivo, não devem ultrapassar sistematicamente: 20 UFC/mililitro a 20°C-22°C, às setenta e duas horas, e 5 UFC/mililitro a 37°C, às vinte e quatro horas, salvo se for comprovado corresponder ao desenvolvimento do seu microbismo natural;

e) Na água mineral natural utilizada nos estabelecimentos termais por via externa (banhos e duchas), os teores totais de microrganismos referidos na alínea c), após cultura em meio nutritivo, não devem ultrapassar sistematicamente: 100 UFC/mililitro a 20°C-22°C,

às setenta e duas horas, e 20 UFC/mililitro a 37°C, às vinte e quatro horas, salvo se for comprovado corresponder ao desenvolvimento do seu microbismo natural.

Sempre que não se verifiquem as condições previstas nas alíneas d) e e), deverá o explorador do estabelecimento termal demonstrar a tomada de medidas corretivas e comprovar a sua eficácia.

Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O controlo de qualidade interno está bem definido em procedimentos internos que referem quais os ensaios que devem ser realizados e qual a sua frequência. Na área da microbiologia o CQI consiste na avaliação das condições de esterilidade, na construção de cartas controlo e na avaliação de duplicados e de paralelos para cálculo de critérios de precisão e de incertezas, associados a cada parâmetro.

Controlo da Esterilidade

O laboratório de microbiologia deve ter um programa de monitorização das condições de esterilidade apropriado, determinar as contagens ambientais aceitáveis e estabelecer as ações corretivas necessárias para quando estes limites forem ultrapassados. A análise dos dados deve permitir a determinação de tendências nos níveis de contaminação. A esterilidade de todo o material utilizado deve ser assegurada, procedendo a verificações periódicas.

Os ensaios em branco têm como principal finalidade avaliar as condições de esterilidade durante todo o processo analítico no que se refere à esterilidade do meio, do diluente (quando aplicável) assim como a eficácia dos operadores. São efetuados diariamente para cada tipo de parâmetro analisado com uma amostra de água estéril sobre a qual se realizam as filtrações, diluições, inoculações e incubações como se de uma amostra normal se tratasse.

Cartas Controlo

Como ferramenta de controlo de qualidade analítica dos ensaios microbiológicos de águas, o LSP Guarda utiliza Materiais de Referência Certificados (MRC), que são preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Uma das utilidades dos MRC é a construção de cartas guia. Com base nos 10 primeiros resultados obtidos a partir de um lote de MRC, é efetuado o cálculo da média e do desvio padrão (S). A partir destes dados é elaborada uma carta guia, que estabelece os

limites de aviso (média $\pm 2S$) e os limites de ação (média $\pm 3S$). Após a análise de 20 MRC é feita uma nova avaliação dos limites da carta controle, com o cálculo da nova média e respetivo desvio padrão. Mensalmente é efetuada uma análise dos MRC, englobando todos os parâmetros analisados no LSP, e os resultados são registados na carta controle elaborada anualmente. Deve ser efetuada uma avaliação de causas sempre que:

- Um resultado ultrapasse o limite de ação;
- Dois em três resultados consecutivos excederem os limites de aviso;
- Ocorrerem nove resultados consecutivos no mesmo lado da média;
- Seis resultados consecutivos aumentarem ou diminuiram continuamente.

Cálculo de Critérios de Precisão e de Incertezas

Para assegurar a repetibilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos para uma determinada análise pelo mesmo analista ou entre analistas, está implementado um programa de realização de ensaios em duplicado e paralelo. Assim no LSP são efetuados ensaios em duplicado e paralelo quinzenalmente, para cada parâmetro analisado, a partir de amostras natural ou artificialmente contaminadas (spiked samples) e ainda aquando da participação nos ensaios interlaboratoriais. O estudo dos duplicados permite calcular o critério de precisão e o estudo dos paralelos permite calcular a incerteza do resultado associado a cada parâmetro. Para estimar a incerteza associada a cada ensaio microbiológico o LSP segue a metodologia descrita no Guia 29 da RELACRE.

Mensalmente o laboratório avalia ainda se a diferença entre as contagens efetuadas por técnicos diferentes não é superior a 10%, através da contagem de UFC e NMP para uma ou mais amostras positivas, comparando os resultados das contagens.

Garantia da Qualidade de meios de cultura e reagentes

Um dos principais objetivos do laboratório de microbiologia é detetar e quantificar uma ampla variedade de microrganismos utilizando para esse efeito meios de culturas adequados. Os meios de cultura devem reunir os requisitos necessários para proporcionar resultados reprodutíveis e consistentes. Para uma análise microbiológica fiável é essencial definir os critérios mínimos de aceitação dos meios de cultura descritos nos documentos normativos. Os fabricantes de meios de cultura e reagentes prontos a usar devem ter um sistema de gestão certificado de acordo com a ISO 9001 e emitir certificados de qualidade dos meios que fornecem de acordo com a ISO 11133.

Controlo de Qualidade Externo (CQE)

A necessidade de transmitir informação correta, assim como de obter resultados fiáveis e comparáveis enfatizam a importância da Garantia da Qualidade. Por outro lado, a participação em esquemas de Avaliação Externa da Qualidade constitui uma ferramenta imprescindível no âmbito do Controlo da Qualidade Analítica implementado no laboratório.

Em 1996, foi desenvolvido o EQUASE Project – Extension of Quality Assurance in Water Microbiology to Cohesion Countries, para implementação de um sistema de garantia da qualidade em Microbiologia de Águas, em sete Estados Membros da UE (Portugal, Espanha, Bélgica, Irlanda, Alemanha, Grécia e Itália). Em Portugal, estiveram envolvidos 38 laboratórios, tendo os Laboratórios de Microbiologia de Águas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Instituto Ricardo Jorge) sido líderes nacionais neste projeto.

Em 2000, tem início no Instituto Ricardo Jorge o “EQUASE – Programa de Garantia da Qualidade em Microbiologia da Água”, integrado numa rede europeia coordenada pelo então PHLS – Public Health Laboratory Service, de Newcastle. A partir de 2009, o Instituto Ricardo Jorge passou a gerir o “Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade em Microbiologia de Águas”, integrado num Programa mundial que conta com a participação de laboratórios, de mais de 50 países coordenado pela Food and Environment Proficiency Testing Unit (FEPTU) da Public Health England (PHE) de Londres (desde o dia 1 de Abril de 2013, a Health Protection Agency (HPA) foi integrada na nova organização, PHE).

Este programa é o seguido atualmente pelo LSP e inclui seis esquemas: *Legionella* Isolation Scheme, Recreational and Surface Water Scheme, Drinking Water Scheme, Bottled and Mineral Water Scheme, Dialysis Water Scheme e Hospital Tap Water Scheme, criados para diferentes tipos de amostras de água, com diversos níveis de contaminação microbiana.

Evolução do Número de amostras analisadas no LSP

Desde 2015, altura em que iniciei funções no LSP, que é evidente o aumento do volume de trabalho do laboratório, que tem sido acompanhado da contratação de pessoal afeto ao mesmo bem como do número de parâmetros acreditados pelo IPAC.

O LSP é sujeito a auditorias internas e externas frequentemente e todas as equipas são unânimes e salientam o espírito de equipa e a elevada cooperação e motivação de todos os envolvidos neste projeto. O laboratório apresenta todas as ferramentas para se destacar no panorama da Saúde Pública do centro do país, estando em constante atualização com a implementação de metodologias e vanguarda na área.

Nº Total de Amostras 2016

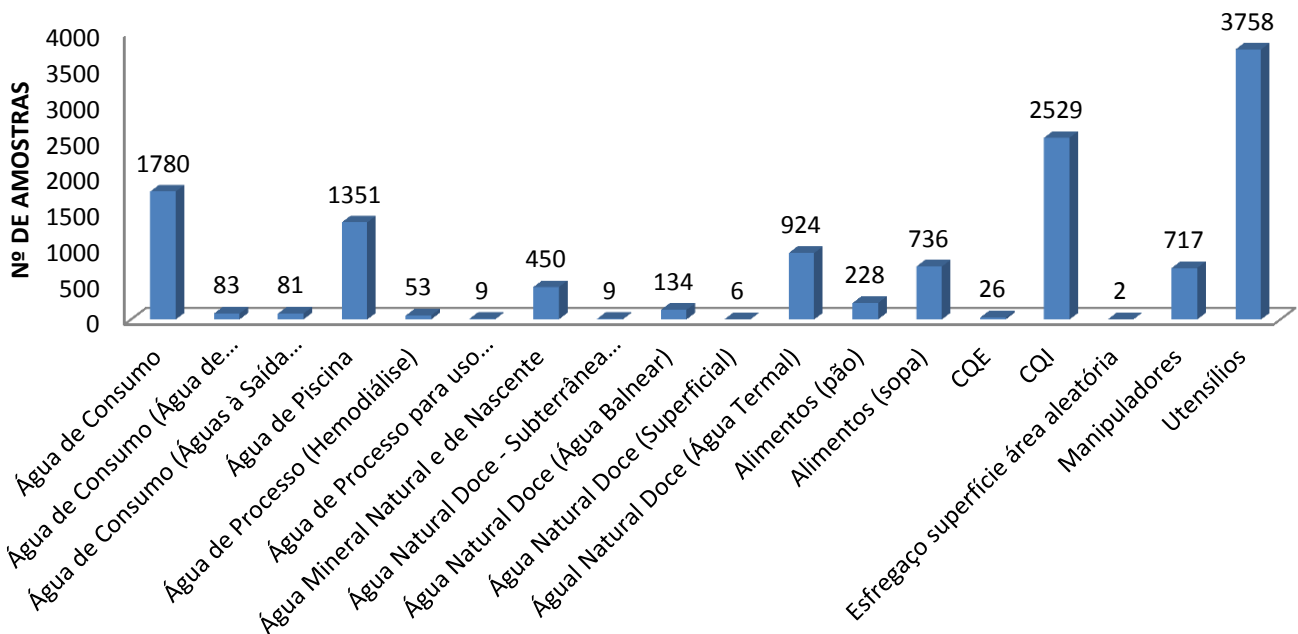


Gráfico 3: Esquema gráfico do número de amostras analisadas no LSP em 2016

Das 14782 águas analisadas desde 1 de Abril de 2015, 4500 apresentaram incumprimentos:

- 473 amostras de águas termais em parâmetros microbiológicos;
- 1717 amostras de águas de consumo, 851 com incumprimento em parâmetros microbiológicos e as restantes em parâmetros físico-químicos;
- 1972 amostras de águas de piscinas, 708 com incumprimento em parâmetros microbiológicos e as restantes em parâmetros físico-químicos.

Nº Total de Amostras 2017

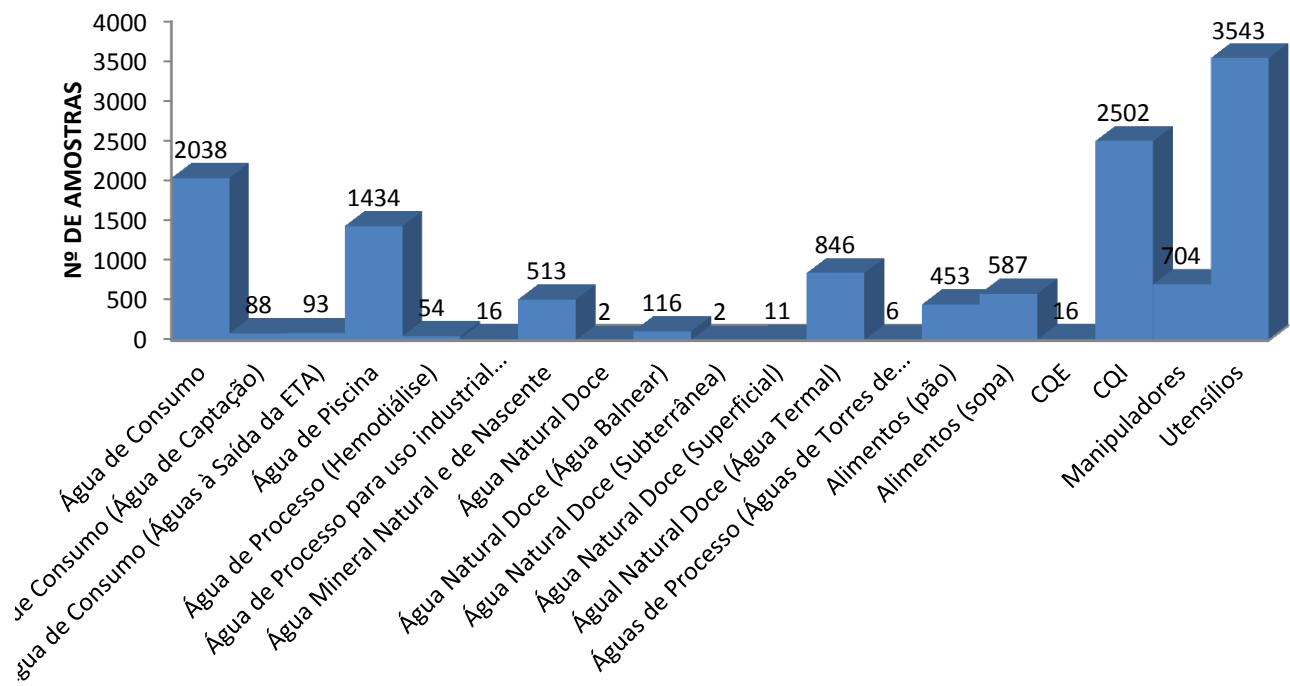


Gráfico 4: Esquema gráfico do número de amostras analisadas no LSP em 2016

Referências Bibliográficas

1. ALMEIDA, Cláudia Patrícia de Sousa. **A Importância do Sector Convencionado das Análises Clínicas no SNS.** 2014.
2. Hospitais da Universidade de Coimbra, Serviço de Patologia Clínica. **Manual de Análises - Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Urgência e Laboratório de Imunologia.** 1ª Revisão. Janeiro de 2012.
3. TSUNG, SH. **Creatine Kinase Isoenzyme Patterns in Human Tissue Obtained at Surgery.** Clin Chem 1976;22:173-175.
4. LOTT, JA. **Serum Enzyme Determinations in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction: An Update.** Hum Pathol 1984;15:706-716.
5. GULBIS, B. **Mass Concentration of Creatine Kinase MB Isoenzyme and Lactate Dehydrogenase Isoenzyme I in Diagnosis of Perioperative Myocardial Infarction after Coronary Bypass Surgery.** Clin Chem 1990;36:1784-1788.
6. GALEN, R.S.; GAMBINO, S.R. **Isoenzymes of CPK and LDH in Myocardial Infarction and Certain Other Diseases.** Pathobiol Ann 1975;5:283-315.
7. CUMMINS, B.; AUCKLAND, MS; CUMMINS, P. **Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction.** American Heart Journal 1987; 113 (6): 1333-1344.
8. BODOR, G.S. et al. **Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction.** Clinical Chemistry 1992; 38(11): 2203-2214.
9. LARUE, C. et al. **Cardiac-specific immunoenzymometric assay of troponin-I in the early phase of acute myocardial infarction.** Clinical Chemistry 1993; 39(6): 972-979.

10. BODOR, G.S. **Cardiac troponin-I: A highly specific marker for myocardial infarction.** Journal of Clinical Immunoassay 1994; 17(1): 40-44.
11. ADAMS, J.E. *et al.* **Cardiac troponin-I: A marker with high specificity for cardiac injury.** 1993; Circulation 88(1): 101-106.
12. ADAMS, J.E. *et al.* **Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin-I.** New England Journal of Medicine 1994; 330(10): 670-674.
13. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **Myocardial Infarction redefined** – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2000; 36: 959-969.
14. BRAUNWALD, E. *et al.* **ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction – summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines** (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina). J Am Coll Cardiol 2002; 40: 1366-1374.
15. JAFFE, A.S. *et al.* **Biomarkers in acute cardiac disease – the present and the future.** J Am Coll Cardiol 2006; 48: 1-11.
16. WAXMAN, D.A. *et al.* **A model for troponin-I as a quantitative predictor of in-hospital mortality.** J Am Coll Cardiol 2006; 48: 1755-1762.
17. ANTMAN, E.M. *et al.* **Cardiac specific troponin-I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes.** New England Journal of Medicine 1996; 335(18): 1342-1349.

18. KONTOS, M.C. *et al.* **Implication of different cardiac troponin-I levels for clinical outcomes and prognosis of acute chest pain patients.** J Am Coll Cardiol 2004; 43: 958-965.
19. BROGAN, G.X. *et al.* **Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus ck-mb for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department.** Annals of Emerg. Med.1994;4: 665-671.
20. CARRARO, P. *et al.* **A new immunoassay for the measurement of myoglobin in serum.** Journal of Clinical Laboratory Analysis 1994;8:70-75.
21. DE WINTER, R.J. *et al.* **Value of Myoglobin, TropT, CK-MB mass in ruling out an acute myocardial infarction in the emergency room.** Circulation 1995; 92(12): 3401-3407.
22. NEWBY, L.K. *et al.* **Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units: The chest pain evaluation by Creatine Kinase-MB, myoglobin, and Troponin I (CHECKMATE) Study.** Circulation 2001;103: 1832-1837.
23. LEVIN, E.R.; GARDNER, D.G.; SAMSON, W.K. **Natriuretic peptides.** N Engl J Med 1998;339: 321-8.
24. WILKINS, M.; REDONDO, J.; BROWN, L. **The natriuretic peptide family.** The Lancet 1997;349: 1307-10.
25. DICKSTEIN, K. **Natriuretic peptides in detection of heart failure.** The Lancet 1998;35: 3-4.
26. CHEN, H.H.; BURNET, J.C. Jr. **The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials.** Proc Assoc Am Physicians 1999;111: 406-16.

27. HIRATA, Y. *et al.* **Measurement of plasma brain natriuretic peptide level as a guide for cardiac overload.** Cardiovascular Res 2001;51: 585-91.
28. MAIR, J.; HAMMERER-LERCHER, PUSCHENDORF, B. **The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure.** Clin Chem Lab Med 2001;39: 571-88.
29. CLERICO, A.; DEL RY, S.; GIANNESI, D. **Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods.** Clin Chem 2000;46: 1529-34.
30. YAN, W. *et al.* **Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme.** Proc Natl Acad Sci USA 2000;97: 8525-9.
31. KELLY, R.; STRUTHERS, A. **Are natriuretic peptides clinically useful as markers of heart failure?** Ann Clin Biochem 2001;38: 94-102.
32. DALY, C.; FOX, K. HENEIN, M. **Natriuretic peptides in the diagnosis of heart disease – first amongst equals?** Intl J Cardiol 2002;84: 107-113.
33. TABBIBIZAR, R.; MAISEL, A. **The impact of B-type natriuretic peptide levels on the diagnoses and management of congestive heart failure.** Curr Op Cardiol 2002;17: 340-45.
34. BERGER, R *et al.* **B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure.** Circulation 2002;105: 2392-97.
35. KOGLIN, J. *at al.* **Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure.** J Am Coll Cardiol 2001;38: 1934-41.
36. CHENG, V. *et al.* **A rapid bedside test for B-type natriuretic peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study.** J Am Coll Cardiol 2001;37: 386-91.

37. STANEK, B. *et al.* **Prognostic evaluation of neurohumoral plasma levels before and during beta-blocker therapy in advanced left ventricular dysfunction.** J Am Coll Cardiol 2001;38: 436-42.
38. DE LEMOS, J.A. *et al.* **The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes.** N Engl J Med 2001;345: 1014-21.
39. OMLAND, T. *et al.* **Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction.** Circulation 1996;93: 1963-69.
40. VENTURA, Ana Patrícia *et al.* **Valor da Procalcitonina como marcador de infeção bacteriana no pós-operatório.** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
41. CARVALHO, Daniela. **Como Interpretar a Gasometria de Sangue Arterial.** Hospital da Arrábida. 2013.
42. RIBEIRO, Alexandra. **Farmacologia dos Antibióticos Aminoglicosídeos.** Universidade Fernando Pessoa. 2017.
43. JONSSON, O.G.; KAMEN, B.A. **Methotrexate and childhood leukemia.** Cancer Investigation 1991; 9(1): 53-60.
44. SATER, G. *et al.* **Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis on the effects of preoperative chemotherapy with single-agent high-dose methotrexate: A scandinavian sarcoma group study.** Journal of Clinical Oncology 1991; 9(10): 1766-75.
45. POELES, T.J. *et al.* **A randomized trial comparing combination chemotherapy using mitomycin C, mitozantrone and methotrexate (3M) with vincristine, anthracycline and cyclophosphamide (VAC) in advanced breast cancer.** Br J Cancer 1991; 64: 406-10.
46. KICKILHTER, E.J.; NORMAN, R.J. **The gonads.** Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation, 2nd ed. St. Louis: CV Mosby, 1989. p.650–63.

47. LIWNICKZ, B.H., LIWNICZ, R.G. **The hypothalamopituitary system.** Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation, 2nd ed. St. Louis: CV Mosby, 1989. p.613–9.
48. SCOTT, M.G. *et al.* **Hormonal evaluation of female infertility and reproductive disorders.** Clin Chem. 1989;35: 620–29.
49. BUTT, W.R.; BLUNT, S.M. **The role of the laboratory in the investigation of infertility.** Ann Clin Biochem. 1988;25: 601–9.
50. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Gonadotropins (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone).** In: Tietz NW, editor. Textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994. p.1679.
51. CHATTORAJ, S.C.; WATTS, N.B. **Endocrinology.** In: Tietz NW, editor. Fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders, 1987. p.575.
52. FILICORI, M.; BUTLER, J.P.; CROWLEY, W.F. Jr. **Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human.** J Clin Invest 1984;73: 1638–47.
53. GOLSDSTEIN, D. *et al.* **Correlation between estradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency.** Fertil Steril 1982;37(3): 348–54.
54. MAIS, V. *et al.* **Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.** J Clin Endocrinol Metab 1987;64: 1109–14.
55. HENZEL, M.R. **Contraceptive hormones and their clinical use.** In: Yen SSC, Jaffe RB, editors. Reproductive endocrinology. Philadelphia: WB Saunders, 1991. p.814.
56. RUSSELL, P.T. **Pregnancy and fetal function.** In: Kaplan LA, Pesce AJ, editors. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. 2nd ed. St. Louis: CV Mosby, 1989. p.572.
57. KAPLAN, L.A. **Human chorionic gonadotropin.** In: Kaplan LA, Pesce AJ, editors. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. 2nd ed. St. Louis: CV Mosby, 1989. p.938–44.

58. FRASER, D.W. *et al.* **Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia.** N. Engl. J. Med. 1977;297: 1189-1197.
59. MARSTON, B.J., LIPMAN, H.B.; BREIMAN, R.F. **Surveillance for Legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality.** Arch. Intern. Med. 1994;154: 2417-2422.
60. KOHLER, R.B. **Antigen detection for the rapid diagnosis of Mycoplasma and Legionella pneumonia.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1988;4: 47S-59S.
61. ROIG, J. *et al.* **Comparative study of Legionella pneumophila and other nosocomial-acquired pneumonias.** Chest. 1991;99: 344-50.
62. REINGOLD, A.L. *et al.* **Legionella pneumonia in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness.** J. Infect. Dis. 1984; 149:819.
63. STOUT, J.E. **Legionellosis.** New Eng. J. of Medicine. 1997;337: 682-7.
64. PLOUFFE, J. *et al.* **Serotypes of Streptococcus pneumoniae blood culture isolates from adults in Franklin County, Ohio.** J. Clin. Microbiology 1994; 32:1606-1607.
65. 2. RUIZ-GONZALEZ, A. **Is Streptococcus pneumoniae the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia.** Am. J. of Med. 1999; 106: 385-390.
66. HOLMBERG, H.; KROOK, A.; SJOGREN, A. **Determination of antibodies to pneumococcal C polysaccharide in patients with community-acquired pneumonia.** J. Clin. Microbiology 1985; 22: 808-814.
67. JOHNSTON, R. **Pathogenesis of pneumococcal pneumonia.** Rev. of Infect. Diseases 1991; 13(Suppl 6): S509-S517.

68. ROBBINS, J.B. *et al.* **Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups.** *J. Infect. Diseases* 1983; 148: 1136-1159.
69. WISELKA, Martin. **Specialists view on pneumococcal meningitis.** www.eclipse.co.uk/miningitis.information/text/medic-guide/pm.htm.
70. CETRON, Martin *et al.* **Chapter 9: Pneumococcal Disease.** Meningitis Foundation of America. www.musa.org/pneumococ.htm.
71. HOWARD, R.J. *et al.* **Secretion of a Malarial Histidine-rich Protein (Pf. HRP II) from Plasmodium falciparum-infected Erythrocytes.** *J. Cell Biol.*, 103, 1269-1277.
72. ROCK, E.P. *et al.* **Comparative Analysis of the Plasmodium falciparum Histidine-Rich Proteins HRP-I, HRP-II, and HRP-III in Malaria Parasities of Diverse Origin.** *Parasitol.*, 95, 209-227.
73. PARRA, M.E. *et al.* **Identification of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 in the Plasma of Humans with Malaria.** *J. Clin. Microbiol.*, 29, 1629-1634.
74. RODRIGUEZ-DEL VALLE, M. *et al.* **Detection of Antigens and Antibodies in the Urine of Humans with Plasmodium falciparum Malaria.** *J. Clin. Microbiol.*, 29, 1236-1242.
75. **Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 70. 1997.
76. **Saúde Reprodutiva. Doenças Infeciosas e Gravidez.** Orientações Técnicas Direção Geral da Saúde. 2000.
77. WILLIS, M.S.; SOUTHERN, P.; LATIMER, M.J. **Toxoplasma infection. Making the best use of laboratory tests.** *Infect Med* 2002; 19: 522-532.

78. JONES, J.L. *et al.* **Congenital Toxoplasmosis: A Review.** CME Review Article Vol. 56, Number 5 2001; 296-305.
79. MONTOYA, J.G. **Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis.** Journal of Infectious Diseases 2002; 185 (Suppl 1) 73-82.
80. ISRAELSKI, D.M.; REMINGTON, J.S. **Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host.** Curr Clin Top Infect Dis 1993; 13: 322-56.
81. MARTA, Filipa. **Borreliose de Lyme em Portugal: (novos) aspetos clínico-laboratoriais do diagnóstico da infeção humana.** Universidade de Lisboa. 2009.
82. PESSEGUEIRO, Pedro; BARATA, Conceição; CORREIA, José. **Brucelose – Uma revisão sistematizada.** Medicina Interna Vol. 10, N. 2, 2003.
83. SAIKKU, P. *et al.* **An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci*.** J Infect Dis 1985; 151: 832-9.
84. GRAYSTON, J.T.; KUO, C.C.; WANT, S.P.; ALTMAN, J. **A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections.** N Engl J Med 1986; 315: 161-8.
85. GRAYSTON, J.T. *et al.* **A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR.** J Infect Dis 1990;161(4):618-25.
86. GRAYSTON, J.T. ***Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infections in children.** PediatrInfectDis J 1994; 13:675.
87. PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S.; BLASI, F.; ALLEGRA, L.; **MOWGLI study group: Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections.** Clin Infect Dis 2001;32(9):1281-9.
88. KUO, C.C. *et al.* ***Chlamydia pneumoniae*.** Clin Microbiol Rev 1995;8:451-61.
89. KAUPPINEN, M.; SAIKKU, P. **Pneumonia Due to *Chlamydia pneumoniae*: Prevalence, Clinical Features, Diagnosis, and Treatment.** Clin Infect Dis 1995;21(3): 244-52.

90. DELLA SANTA, L. *et al.* **Infezioni polminari emergenti nel bambino. II- Polmoniti da microplasma.** *Minerva Pediatr* 1994; 46: 147-52.
91. **Community-acquired pneumonia in children.** Cambridge. Cambridge Medical Publications. 1995.
92. Maltez, F. *et al.* **Febre escaro-nodular: Casuística de 10 anos (1977-1986). Estudo clínico e epidemiológico de 247 casos.** *O Médico* 1991; 20 (1929): 459-464.
93. DE SOUSA, R. *et al.* **Sobre a realidade da febre escaro-nodular em Portugal.** *Act Med Port* 2003; 16: 429-436.
94. DERRICK, E.H. **“Q” fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation.** *Med J Aust* 1937; 2:281-299.
95. BURNET, F.M.; FREEMAN, M. **Experimental studies on the virus of Q fever.** *Med J Aust* 1937; 2:299-302.
96. COX, H.R.; BELL, E.J. **The cultivation of Rickettsia diaporica in tissue culture and in the tissues of developing chicken embryos.** *Public Health Rep* 1939; 54: 2171-2175.
97. PHILIP, C.B. **Comments on the name of the Q fever organism.** *Public Health Rep* 1948; 63: 58-59.
98. <https://www.portaldocidadao.pt/pt/web/instituto-portugues-de-acreditacao/instituto-portugues-de-acreditacao>
99. Decreto-lei n.º 23/2011, de 11 de Fevereiro
100. ISO/IEC 17025 - Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração
101. ISO 9001 – Certificação – Sistema de Gestão da Qualidade
102. ISO 19458 – Water quality – Sampling for microbiological analysis

103. Decreto-Lei nº306/2007
104. Decreto-Lei nº152/2017
105. Portaria nº1220/2000 de 29 de Dezembro
106. Decreto-Lei n.º 141/2009, de 16 de Junho
107. Decreto Regulamentar n.º 5/97, de 31 de Março
108. “Manual de Boas Práticas de Medicina Física e de Reabilitação“, publicado pelo Aviso n.º 9448/2002 (2ª série) em 29 de Agosto
109. Portaria n.º 1212/2010, de 30 de Novembro
110. Decreto-Lei n.º 65/97, de 31 de Março
111. Decreto Regulamentar n.º 5/97, de 31 de Março
112. EN 15975-2 Security of drinking water supply – Guidelines for risk and crisis management Part 2: risk management
113. Circular Normativa nº14/DA de 21/8/2009
114. Decreto Regulamentar 5/97 de 31 de Março
115. Decreto-Lei nº113/2012 de 23 de Maio
116. Decreto-Lei nº236/98 de 1 de Agosto
117. Decreto-Lei nº156/98 de 6 de Junho
118. Decreto-Lei n.º 283/91, de 9 de Agosto